

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Barbora Majerová

**Studium vlivu inhalačního podání IgY a Fab fragmentů z pohledu
iniciace zánětu plic**

Effect of inhaled IgY and Fab fragments on the lung inflammation

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 5. 2013

.....
Bc. Barbora Majerová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, pomoc při řešení problémů a trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc., prof. MUDr. Václavu Mandysovi, CSc., RNDr. Šárce Růžičkové, PhD. a RNDr. Jindře Vrzalové, PhD. za umožnění realizace experimentální části této práce.

Abstrakt

Respirační systém je v nepřetržitém kontaktu s cizorodými agens z okolního prostředí, která se mohou stát iniciátory zánětlivých procesů. Mechanické bariéry a vzájemná vyváženost přirozené a získané imunity zajišťuje obranu před těmito činiteli bez vyvolání zánětlivé reakce. Za určitých okolností však může dojít k nadměrné aktivaci imunitního systému, která vede k produkci nejrůznějších zánětlivých cytokinů a mediátorů, např. faktorů TNF- α a GM-CSF nebo interleukinů IL-1 β a IL-6.

Dýchací systém pacientů trpících cystickou fibrosou není schopen efektivní obrany před bakteriálními infekcemi. Vhodným prostředkem pro ochranu před oportunními patogeny by se mohly stát vaječné slepičí imunoglobuliny (IgY), jejichž zvláštností je to, že po vazbě na antigen neaktivují komplement.

Jedním ze způsobů objasnění imunogenicity studované látky je expozice experimentálního zvířete a následné měření koncentrace produkováných zánětlivých cytokinů. V této práci byl zjišťován potenciální zánětlivý vliv IgY a z nich připravených Fab fragmentů, které byly společně s ovalbuminem použity k dlouhodobé inhalační expozici potkanů kmene Wistar. Správný průběh inhalačního pokusu byl potvrzen imunochemickým stanovením sérových protilátek specifických proti inhalovanému proteinu. V získané plicní laváži a krevním séru byly imunochemicky vyhodnoceny koncentrace zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a růstového faktoru GM-CSF metodou Bio-Plex, které vyloučily schopnost testovaných látek vyvolat zánět. Bylo rovněž provedeno histologické vyšetření plicní tkáně a cytologická analýza laváže. Obě pozorování nepotvrdila přítomnost procesů spojených se zánětlivými změnami plicního parenchymu.

Pro srovnání byly testovaným látkám (IgY, Fab fragmentům, ovalbuminu a lipopolysacharidu) exponovány i buněčné linie, mezi které patřila plicní nádorová linie A549 a dvě imortalizované buněčné linie lidského respiračního epitelu: NuLi-1 a CuFi-1. V buněčném médiu bylo provedeno shodné stanovení zánětlivých cytokinů.

Na základě provedených vyhodnocení byla vyloučena schopnost IgY a Fab fragmentů vyvolat zánět plicní tkáně a potvrzena indukce zánětlivých procesů po stimulaci pomocí OVA.

klíčová slova: plíce, imunita, slepičí imunoglobuliny, cytokiny, potkani, buňky

Abstract

Human respiratory system is in constant contact with heterogeneous environmental agents, which can possibly become initiators of inflammatory responses. Mechanical barriers and balance between the innate and adaptive immunity provide protection from external agents without initiation of any inflammatory response. Under certain circumstances, overreaction of the immune system might occur and leads to the production of various inflammatory cytokines and mediators such as TNF- α and GM-CSF factors or interleukins IL-1 β and IL-6.

Respiratory system of the human suffering from cystic fibrosis is unable to defend against bacterial infections effectively. Chicken egg immunoglobulins (IgY) could eventually become a suitable tool for the protection from opportunistic pathogens, because they, when bound to antigen, don't activate the complement cascade.

One method of determining the immunogenicity of the studied agent is the exposure of experimental animal and further measurement of inflammatory cytokine concentration. In this thesis, the potential inflammatory effect of IgY, IgY-derived Fab fragments and ovalbumin was determined after an exposure of Wistar rats by long-term inhalation. Correct implementation of inhalation experiment was confirmed via production of specific antibodies against the inhaled protein via immunochemical determination. Concentrations of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and GM-CSF factor in the rat bronchoalveolar lavage and blood serum were determined immunochemically via Bio-Plex method. The results didn't show any proinflammatory capability of tested substances. Histological examination of lung tissue and cytological analysis of lavages were performed as well. Both observations excluded presence of inflammation-related processes altering lung parenchyma.

In addition for comparison to *in vivo* conditions, substances of interest were tested with three human cell lines: A549 lung cancer cell line and two immortalized cell lines derived from human respiratory epithelium: NuLi-1 and CuFi-1. Identical inflammatory cytokines were analyzed in the medium.

Based on the determinations performed, the proinflammatory capability of IgY and Fab fragments to induce lung inflammation was excluded, while some ability of OVA was detected.

Key words: lungs, immunity, chicken antibodies, cytokines, rats, cells (In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	12
1.1 Respirační imunita	12
1.1.1 Přirozená respirační imunita	12
1.1.1.1 Mechanické plicní bariéry	12
1.1.1.2 Antimikrobiální látky	13
1.1.1.3 Alveolární makrofágy	16
1.1.1.4 Polymorfonukleární leukocyty a likvidace pohlceného mikroorganismu	16
1.1.1.5 Cytokiny	17
1.1.2 Adaptivní respirační imunita	22
1.1.2.1 Respirační imunita zprostředkovaná buňkami	23
1.1.2.2 Respirační imunita zprostředkovaná protilátkami	24
1.2 Imunologie zánětlivého procesu	25
1.2.1 Akutní odpověď organismu na zánět	25
1.2.1.1 Lokální zánětlivá odpověď	26
1.2.1.2 Systémová zánětlivá odpověď	28
1.2.2 Chronická odpověď organismu na zánět	28
1.3 Cystická fibrosa	29
1.3.1 Zánět plic u pacientů trpících cystickou fibrosou	30
1.4 Protilátky	31
1.4.1 Savčí protilátky	31
1.4.2 Slepíčí protilátky	33
1.4.3 Afinity a avidity protilátek k antigenu	36
1.4.4 Antigenicita a imunogenita antigenu	36

2 Cíl práce	38
3 Materiál a metody	39
3.1 Použité chemikálie a materiál	39
3.2 Modelové organismy.....	41
3.3 Použité pomůcky.....	41
3.4 Použité přístroje	42
3.5 Použité metody.....	43
3.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace IgY	43
3.5.2 Štěpení imunoglobulinů Y (IgY) a separace fragmentů.....	44
3.5.2.1 Štěpení IgY enzymem papainem.....	44
3.5.2.2 Separace štěpných produktů IgY chromatografií na iontoměníči	45
3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.....	46
3.5.4 Specifická detekce proteinů metodou „Western blot“.....	48
3.5.5 Inhalační experiment	51
3.5.5.1 Inhalační aplikace antigenů	51
3.5.5.2 Izolace experimentálního materiálu	52
3.5.5.3 Analýza produkce protilátek proti podaným antigenům metodou ELISA	53
3.5.5.4 Analýza produkce zánětlivých cytokinů metodou Bio-Plex	54
3.5.6 Expoziční experiment na buněčných liniích.....	56
3.5.6.1 Kultivace buněk linie A549.....	56
3.5.6.2 Kultivace buněk linie NuLi-1 a CuFi-1.....	57
3.5.6.3 Expoziční testy	58
4 Výsledky	61
4.1 Příprava proteinových vzorků.....	61
4.1.1 Štěpení IgY a separace Fab fragmentu	61
4.1.2 Specifická detekce IgY a Fab	65

4.2 Inhalační expozice potkanů proteinovým vzorkům	66
4.2.1 Imunogenicita inhalačně podaných antigenů	67
4.2.2 Vliv inhalovaných antigenů na vyvolání zánětu plic.....	68
4.2.3 Mikroskopická analýza BAL a histologické vyšetření exponované plicní tkáně	72
4.3 <i>Ex vivo</i> působení antigenů na plicní buňky.....	75
4.3.1 Kultivace buněk A549, NuLi-1 a CuFi-1	76
4.3.2 Vliv proteinových vzorků na produkci cytokinů.....	77
4.3.2.1 Koncentrace zánětlivého cytokinu TNF- α	77
4.3.2.2 Koncentrace zánětlivého cytokinu IL-1 β	78
4.3.2.3 Koncentrace zánětlivého cytokinu IL-6	81
4.3.2.4 Koncentrace růstového faktoru GM-CSF.....	83
5 Diskuze.....	86
6 Souhrn	92
Seznam použité literatury	93

Seznam použitých zkratek

A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
A ₄₀₅	absorbance při 405 nm
AM	alveolární makrofágy
APC	„antigen-presenting cells“ – buňky prezentující antigen
APS	„ammonium persulfate“ – peroxodisíran amonný
BAL	bronchoalveolární laváž (výplach bronchů)
BCIP/NBT	„5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium“ – 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrotetrazolová modř
BEBM	„Bronchial Epithelial Basal Medium“ – basální médium pro plicní epiteliální buňky
BEGM	„Bronchial Epithelial Cell Growth Medium“ – růstové médium pro plicní epiteliální buňky
BIS	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
BPE	„bovine pituitary extract“ – extrakt hovězí hypofýzy
BSA	„bovine serum albumin“ – hovězí sérový albumin
C	„constant“ – konstantní (doména)
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ – transmembránový regulátor cystické fibrosy
CR	„complement receptor“ – komplementový receptor
CRD	„carbohydrate recognition domain“ – doména rozpoznávající sacharidy
CXC	rodina chemokinů se dvěma cysteiny na N-terminálním konci, které jsou od sebe odděleny jednou aminokyselinou

C _γ 1 – C _γ 3	konstantní domény těžkého řetězce IgG
C _v 1 – C _v 4	konstantní domény těžkého řetězce IgY
DAB	diaminobenzidin
DEAE	diethylaminoethyl
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“ – kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“ – enzymová imunosorpční analýza
Fab	„antigen-binding fragment“ – fragment vázající antigen
FBS	„fetal bovine serum“ – fetální hovězí sérum
Fc	„crystallizable fragment“ – krystalizující fragment
G-CSF	„granulocyte colony-stimulationg factor“ – faktor stimulující kolonie granulocytů
gIgG	„goat immunoglobulin G“ – koží imunoglobulin typu G
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony-stimulationg factor“ – faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GRO-KC	„growth-regulated oncogene/keratinocyte chemoattractant“ – růstový onkogen/atraktant keratinocytů
H	„heavy“ – těžký (řetězec)
HBD	„human β-defensin“ – lidský β-defensin
hCAP	„human cathelicidin antimicrobial protein“ – lidský cathelicidinový antimikrobiální protein
HD	„human defensin“ – lidský defensin
hEGF	„human endothelial growth factor“ – lidský endoteliální růstový faktor
hIgG	„human immunoglobulin G“ – lidský imunoglobulin typu G

HPV	„human papillomavirus“ – lidský papilomavirus
hTERT	„human telomerase reverse transcriptase“ – lidská telomerasová reverzní transkriptasa
ICAM	„intercellular adhesive molecule“ – mezibuněčná adhezivní molekula
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	interleukin
L	„light“ – lehký (řetězec)
LPS	lipopolysacharid
MAP	„multianalyte profiling“ – analýza více analytů najednou
MHC	„major histocompatibility complex“ – hlavní histokompatibilní komplex
MIP	„macrophage inflammatory protein“ – makrofágový zánětlivý protein
NK	„natural killers“ – přirozené zabíječské buňky
OVA	ovalbumin
PE	„phycoerythrin“ - fykoerytrin
PMN	polymorfonukleární leukocyty/neutrofily
PSGL-1	„P-selectin glycoprotein ligand“ – glykoproteinový ligand P-selektinu
PVDF	polyvinylidendifluorid
RANTES	„regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted“ – aktivačně regulovaný protein, exprimovaný a sekretovaný T-lymfocyty
SDS	„sodium dodecyl sulphate“ – dodecylsírany sodný
SP	surfaktantový protein

Tc	„cytotoxic T-cell“ – cytotoxický T-lymfocyt
TCR	„T-cell receptor“ – receptor T-lymfocytů
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TGF	„transforming growth factor“ – transformující růstový faktor
Th	„helper T-cell“ – pomocný T-lymfocyt
TMB	tetramethylbenzidin
TNF	„tumor necrosis factor“ – faktor nádorové nekrózy
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	„variable“ – variabilní (doména)
VCAM	„vascular cell adhesion molecule“ – cévní adhezivní molekula
VEGF	„vascular endothelial growth factor“ – vaskulární endoteliální růstový faktor
V _H	variabilní doména těžkého řetězce
V _L	variabilní doména lehkého řetězce

1 Úvod

1.1 Respirační imunita

Výstelka plic tvoří největší epiteliální povrch lidského těla. Denně projde respiračním traktem zhruba 10 000 litrů vzduchu, který s sebou nese velké množství nežádoucích částic a infekčních mikroorganismů. Proto bylo nutné, aby se vyvinul účinný mechanismus, který by lidské plíce ochránil.¹

Respirační obranné mechanismy lze rozdělit do dvou kategorií: vrozená (nespecifická) a získaná (specifická) imunita. Součástí přirozené imunity jsou, kromě buněčné a humorální složky, také mechanické bariéry, které vystavují infekčnímu agens první selektivní překážku. Mechanismy přirozené imunity účinkují proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na jejich společné strukturní nebo funkční rysy. Získaná imunita se oproti přirozené vyznačuje řadou mechanismů, probíhajících po kontaktu s určitým antigenem. Mechanismy specifické imunity jsou důležité pro eliminaci infekce způsobené zapouzdřenými bakteriemi, viry a vnitrobuněčnými patogeny, kteří přežívají uvnitř makrofágů.²

1.1.1 Přirozená respirační imunita

Do nespecifických obranných mechanismů respiračního traktu patří tyto faktory: mechanické plicní bariéry, buněčná složka a humorální složka imunity. Vrozená imunita se vyznačuje produkcí antimikrobiálních agens a cílenou lokalizací fagocytujících buněk, jakými jsou zejména alveolární makrofágy (AM) a polymorfonukleární leukocyty (PMN) a dále makrofágy a NK buňky (z angl. „natural killers“ – přirozené zabíječské buňky). V případě respirační infekce jsou tyto buňky velmi rychle filtrovány do plic z nejbližšího okolí. Hlavní funkcí přirozené imunity je „clearance“ cizorodých částic uložených v povrchových vrstvách respiračního epitelu a odstranění bakteriálních patogenů z plicních sklípků.

1.1.1.1 Mechanické plicní bariéry

Mechanické bariéry představují první překážku, která brání infekčnímu agens v průniku do respiračního traktu. O tom, do jaké hloubky je nežádoucí částice propuštěna, rozhoduje

její velikost. Infekční činitele o průměru větším, než 5 μm bývají zpravidla zachyceni ve vyšších cestách dýchacích v místě prvotního kontaktu inhalovaného vzduchu s plicemi. Takovéto částice se usazují v nosní dutině, nosohltanu, ve střední části hltanu, podél trachey a v průduškách.³ K eliminaci těchto agens slouží mukociliární aparát obsahující muciny, komplexní glykoproteiny, které pomáhají zachytit nežádoucí mikroorganismy. Hlen s agens je pohybem řasinkových buněk vypuzen proximálním směrem a poté je spolknut, nebo vykašlán. Infekční činitele o průměru menším než 5 μm , např. bakterie, jsou schopni se těmito obranným mechanismům vyhnout a usazují se v dolních cestách dýchacích. Z tohoto hlediska je důležitá přítomnost dalších funkčních mechanismů, které jsou schopné efektivně vypudit i tyto částice.

1.1.1.2 Antimikrobiální látky

Infekční agens, které se díky své malé velikosti vyhnou eliminaci mechanickými plicními bariérami, podléhají působení antimikrobiálních látek. Jsou jimi různé molekuly, které potencují fagocyty k eliminaci infekčních patogenů, nebo samy působí antimikrobiálně. Tyto částice jsou produkovány buňkami horních i dolních dýchacích cest.⁴⁻¹² Přehled jednotlivých antimikrobiálních látek uvádí Tab. č. 1.²

Tab. č. 1: Antimikrobiální molekuly dýchacích cest

molekula	antimikrobiální aktivita	původ produkce
lysozym	lýze buněk	buňky krevního séra AM PMN
komplement	narušení bakteriální membrány opsonizace mikrobů zesílení fagocytózy chemotaxe	AM pneumocyty II. typu fibroblasty
imunoglobuliny (A a G)	neutralizace toxinů a virů inhibice mikrobiálního růstu a adheze opsonizace mikrobů zesílení fagocytózy aktivace komplementu	B-lymfocyty/ plazmatické buňky
fibronektin	opsonizace mikrobů zesílení fagocytózy inhibice bakteriální adheze chemotaxe	AM fibroblasty epiteliální buňky
laktoferin	zesílení produkce cytokinů usmrcení a aglutinace bakterií	buňky krevního séra

	zvýšení pohyblivosti a adheze PMN	PMN
	podmínění PMN k produkci superoxidu	
transferin	inhibice mikrobiálního růstu	mimo respirační trakt
protein vázající LPS	navázání LPS (lipopolysacharidu) a následné zvýšení produkce cytokinů	mimo respirační trakt
defensiny (α a β)	zvýšení propustnosti mikrobiální membrány	epiteliální buňky PMN
	zvýšení adheze PMN	
	aktivace komplementu	
	stimulace produkce cytokinů a chemokinů (chemotaktických cytokinů)	
kathelicidin	usmrcení bakterií	epiteliální buňky
kolektiny (SP-A a SP-D)	inhibice mikrobiální virulence a adheze	pneumocyty II. typu
	zesílení fagocytózy	
	chemotaxe	
	stimulace influxu AM	
	regulace produkce cytokinů	

AM – alveolární makrofágy, **PMN** – polymorfonukleární leukocyty,

LPS – lipopolysacharid, **SP-A**, **SP-D** – surfaktantový protein A a D

• Lysozym

Lysozym patří mezi nejvýznamnější hydrolytický enzym makrofágů, neutrofilů a eozinofilů. Tento bazický protein o molekulové hmotnosti 14 kDa hydrolyticky štěpí vazbu mezi N-acetylglukosaminem a N-acetylmuramovou kyselinou. Tyto dvě molekuly tvoří peptidoglykany, základní stavební složku buněčné stěny bakterií.¹³

• Defensiny

Defensiny jsou jednořetězcové peptidy o molekulové hmotnosti 3 – 4,5 kDa. Jejich struktura obsahuje šest cysteinových zbytků propojených třemi disulfidickými vazbami. Tyto antimikrobiální peptidy jsou aktivní v boji proti bakteriím, houbovým mikroorganismům a obaleným virům, např. HIV. Antimikrobiální vlastnosti defensinů úzce souvisí s jejich schopností pronikat skrz biologické membrány, nebo v nich vytvářet póry.¹⁴ V lidském těle lze nalézt osm druhů defensinů, z toho šest α -defensinů (lidský defensin HD-1 – HD-6, z angl. „human defensin“) a dva β -defensiny (lidský β -defensin HBD-1 a HBD-2, z angl. „human β -defensin“). Defensin HBD-1 zajišťuje eliminaci mikroorganismů v nepřítomnosti zánětlivých procesů, zatímco HBD-2 je důležitým faktorem infekčních a zánětlivých pochodů. Defensiny HD-1 až HD-4 jsou syntetizovány

především PMN jako odpověď na stimulaci různými zánětlivými podněty, jako je např. chemokin interleukin-8 (IL-8, viz. 1.1.1.5 Cytokiny, str. 17). Koncentrace defensinů významně roste u pacientů se zánětlivými respiračními chorobami, např. chronickou bronchitidou a chronickým obstrukčním onemocněním plic.^{7,9,10}

Antimikrobiální aktivita defensinů může být kompetitivně inhibována vysokou koncentrací solí. Tato inaktivace je klíčovým problémem u pacientů trpících cystickou fibrosou (CF), onemocněním, provázeným chronickými záněty plic. Hlen těchto pacientů obsahuje velmi vysokou koncentraci NaCl a antimikrobiální aktivita defensinů je tímto potlačena.¹⁵ Studie *in vitro* prokázaly účinnost defensinů zdravého pacienta v boji proti *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco defensiny pacienta trpícího cystickou fibrosou uspokojivé výsledky neposkytly.¹⁶ Mechanismus této interakce by měl být podroben dalšímu zkoumání. Jedna teorie však tvrdí, že příčinou je prostá nábojová kompetice, která blokuje interakci mezi kladně nabitým peptidem a záporně nabitou mikrobiální membránou.¹⁷

- **Kathelcidiny**

Rozsáhlá rodina kathericidinů je charakteristická přítomností konzervované N-terminální prekurzorové struktury a vysoce variabilní C-terminální domény, které kódují výsledný protein. Kathelcidiny vykazují antimikrobiální schopnosti vůči bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. Jediným dosud objeveným lidským kathericidinem je hCAP-18 (z angl. „human cathelcidin antimicrobial protein“ – lidský kathericidinový antimikrobiální protein), jehož efekt je zesílen díky spolupůsobení lysozymu a laktoferinu. Funkce kathericidinů je zřejmě významně ovlivněna vysokou koncentrací solí, podobně jako u defensinů. Inaktivace kathericidinů v tekutině dýchacích cest pacientů trpících cystickou fibrosou vyžaduje podrobnější zkoumání.¹¹

- **Kolektiny**

Kolektiny jsou glykoproteiny patřící do rodiny C-lektinů. Tvoří oligomery uspořádané z trimerních podjednotek, složených z N-terminální domény, kolagenové domény,

spojovací domény a domény C-typu, která rozpoznává sacharidy (CRD, z angl. „carbohydrate recognition domain“).¹² Tato C-terminální doména hraje klíčovou úlohu v rozpoznávání mnoha organismů a částic pomocí proteinů SP-A a SP-D. Cílovými agens nejsou jen viry, bakterie a pneumocystis, ale také nemikrobiální částice, např. pylová zrna nebo alergeny roztočů.^{18–23} SP-A a SP-D jsou významnými chemoatraktanty, a díky tomu zesilují fagocytární účinek AM, PMN a monocytů.^{24,25}

1.1.1.3 Alveolární makrofágy

Makrofágy plní důležitou roli jak v přirozené, tak v adaptivní imunitě. Jejich produkce probíhá v kostní dřeni, odkud jsou uvolňovány v podobě nezralých prekurzorů, které obíhají krevním řečištěm a v případě potřeby jsou infiltrovány do plic. Zde jsou diferencovány na konečné stádium alveolárních makrofágů.²⁶

Alveolární makrofágy tvoří první fagocytární bariéru proti infekčním činitelům, kteří díky svým malým rozměrům projdou mechanickou bariérou plic a získají přístup do oblasti respiračního traktu, kde dochází k výměně dýchacích plynů. Tyto buňky vykazují důležité fagocytární, antimikrobiální a sekreční funkce a iniciují zánětlivé a imunitní odpovědi, čímž hrají klíčovou roli v plicní imunitě. Alveolární makrofágy jsou schopné okamžitého pohlcení různých druhů bakterií, a tak konstantně udržují sterilní prostředí citlivého alveolárního povrchu. Některé druhy bakterií, např. *Mycobacterium sp.* nebo *Legionella sp.*, jsou rezistentní vůči působení AM a mohou se replikovat intracelulárně. Eliminace takovýchto patogenů vyžaduje komplexní působení buněčné imunity. Alveolární makrofágy produkují škálu mediátorů působících na PMN, které se během krátké doby infiltrují do postiženého místa. Mezi regulující mediátory patří komplement, IL-8, MIP-2 (z angl. „macrophage inflammatory protein“ – makrofágový zánětlivý protein) a další.²⁷

1.1.1.4 Polymorfonukleární leukocyty a likvidace pohlceného mikroorganismu

Polymorfonukleární leukocyty představují největší rodinu intravaskulárních fagocytů v lidském těle a jsou nezbytnou součástí imunitních mechanismů bojujících proti bakteriálním a mikrobiálním infekcím. V normálním stavu lze v alveolárním prostoru

nalézt jen nízké množství PMN. Tyto fagocyty se však vyskytují ve větších koncentracích v periferním krevním oběhu a jsou schopné velmi rychlé migrace do infikované tkáně.²⁸ Studie potvrzují velmi rychlou infiltraci PMN do plic po stimulaci pomocí LPS: 3 – 4 h po působení LPS tvořily PMN 60 – 80 % celkového počtu buněk v plicní laváži. Takto infiltrované PMN jsou velmi rychle aktivovány stimulací různými cytokiny a dalšími mediátory uvolněnými z infikované oblasti. Mezi tyto podněty patří GM-CSF, TNF- α , IL-8 a MIP-2. Po stimulaci vykazují PMN fagocytární aktivitu, která je dokonce vyšší, než jaké jsou schopné AM. PMN produkují řadu cytokinů, např. TNF- α , IL-1 β , IL-6 a MIP-2.²⁷

Polymorfonukleární leukocyty obsahují tzv. azurofilní granula, která se nebarví zásaditými, ani kyselými barvivami. Uvnitř azurofilních granulí lze nalézt lysozym, myeloperoksidasu, defensiny, hydrolasy, proteasy a kationické proteiny.²⁹ Po pohlcení nežádoucího mikroorganismu polymorfonukleárním leukocytem následuje jeho usmrcení. Tento proces je podmíněn vznikem fagolysozomu s nízkým pH (4 – 5) procesem tzv. fagolysosomální fúze, která představuje fúzi granulí s fagosomem. Dochází k aktivaci membránové NADPH-oxidasy, katalyzující vznik superoxidového radikálu O₂⁻. Z něj vznikají reaktivní kyslíkové intermediáty, např. peroxid vodíku, narušující strukturu DNA a enzymovou aktivitu mikroorganismů. Peroxid vodíku reaguje s chloridovým aniontem za vzniku chlornanových aniontů, vykazujících baktericidní vlastnosti. Reakce je katalyzována myeloperoksidasou.³⁰

Dalším ochranným prostředkem fagocytů je oxid dusnatý (NO), produkovaný enzymovým komplexem NO synthasou. K aktivaci tohoto komplexu dochází především v makrofázích působením cytokinů IFN- γ a TNF- α , které jsou produkovány lymfocyty Th1 (viz. 1.1.2.1 Respirační imunita zprostředkovaná buňkami, str. 23). NO je účinný zejména v boji proti intracelulárním parazitům makrofágů. V kombinaci se superoxidovým radikálem tvoří NO velmi efektivní zbraň imunitního systému.^{30,31}

1.1.1.5 Cytokiny

Pro správné řízení imunitní odpovědi musí buňky imunitního systému mezi sebou efektivně komunikovat. K tomu slouží menší signální polypeptidy zvané cytokiny. Jsou produkovány různými typy buněk po jejich předchozí stimulaci. Vzájemné působení

cytokinů na složky imunitního systému tvoří komplexní síť reakcí, vedoucí k produkci mnoha dalších cytokinů a solubilních faktorů. Jejich působení na buňku se odehrává prostřednictvím specifických buněčných receptorů pro cytokiny. Tímto způsobem je imunitní signální aktivita zesilována, nebo zeslabována.³²

Důležitou roli v imunitě respiračního traktu hrají cytokiny TNF- α (z angl. „tumor necrosis factor“ – faktor nádorové nekrózy), IL-10, IL-12, IL-6, IFN- γ (interferon- γ), G-CSF (z angl. „granulocyte colony-stimulation factor“ – faktor stimulující kolonie granulocytů) a také chemotaktické cytokiny, neboli chemokiny, zejména IL-8.³³ Nejdůležitější cytokiny a mechanismus jejich působení jsou znázorněny na Obr. 1, str. 19.

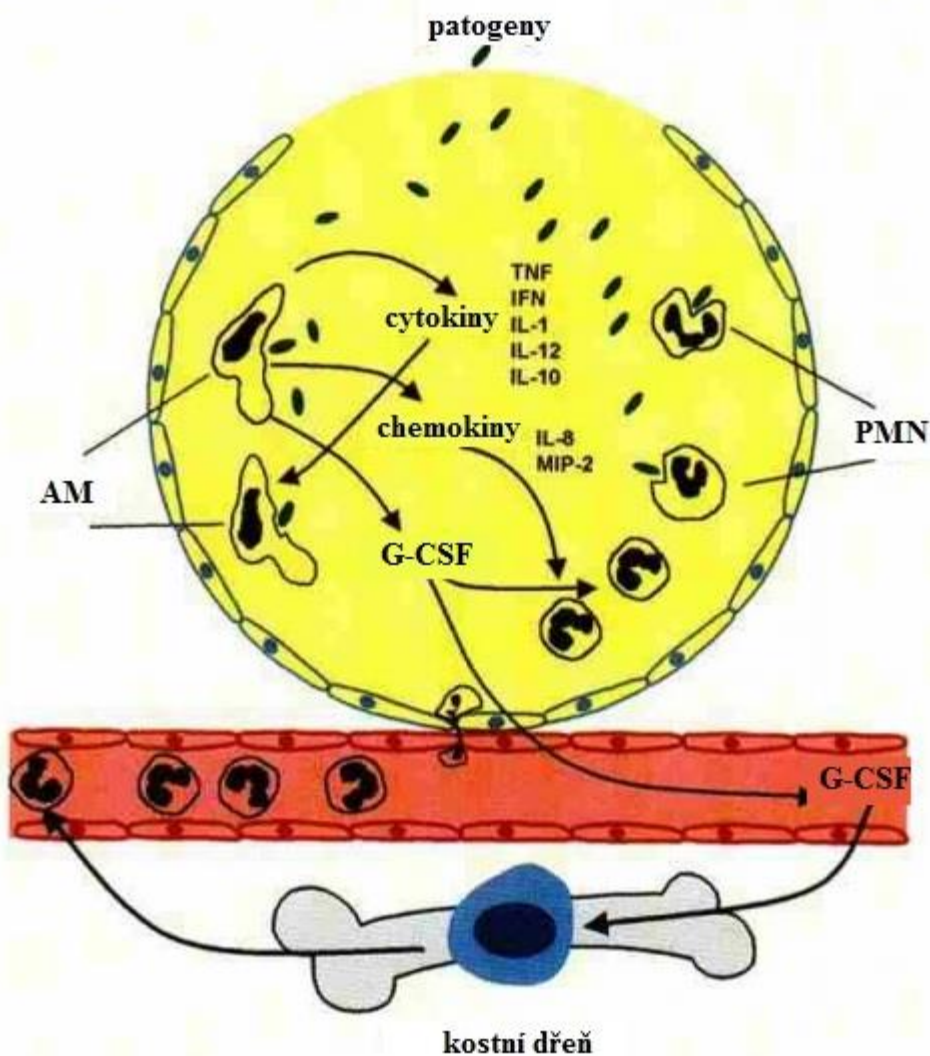
- **TNF- α**

TNF- α způsobuje nejen nekrózu určitých typů nádorových buněk, ale má také celou řadu regulačních prozánětlivých funkcí. TNF- α je po působení specifického i nespecifického zánětlivého podnětu velmi rychle produkován alveolárními makrofágy a je významným prvotním ukazatelem probíhajících imunitních dějů. Jeho přítomnost podněcuje PMN k lokální infiltraci. Nejvýznamnějším stimulem produkce TNF- α je LPS, komponenta buněčné stěny gramnegativních bakterií.³⁴ Důležitou vlastností TNF- α je jeho lokální produkce v napadeném místě. Studie potvrzují, že intravenózní podání LPS vede ke zvýšení koncentrace TNF- α v krevním séru, zatímco v bronchoalveolární laváži (BAL) je jeho hladina téměř nulová. Naopak intratracheální podání LPS nezpůsobuje nárůst koncentrace TNF- α v krevním séru.³⁵ Pokud se však produkce TNF- α zvrhne, může mít za následek septický šok a selhání orgánů. Těmto nežádoucím procesům může být zabráněno podáním protilátky proti TNF- α , která jeho blokáci potlačuje influx PMN do plic. Proto je TNF- α citlivou „dvojsečnou zbraní“ imunitního systému.³⁶

- **IL-10**

Interleukin-10 je významným protizánětlivým cytokinem, který potlačuje produkci mnoha jiných prozánětlivých cytokinů a chemokinů, např. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-12, MIP-2, a MIP-1 α .^{37,38} Interleukin-10 mimo jiné potlačuje určité funkce PMN, včetně produkce superoxidu, fagocytózy a vnitrobuněčného usmrcení bakterií. Imunitní

reakce vyvolané působením IL-10 úzce souvisí s místem iniciace zánětu, podobně jako v případě TNF- α .³⁹



Obr. 1: Cytokiny a buněčné odpovědi imunitního systému plic. Nežádoucí patogen stimuluje po průniku do respiračního traktu AM k produkci cytokinů, chemokinů a G-CSF. Cytokiny regulují funkci AM. Chemokiny působí na PMN, které vykazují fagocytární aktivitu. Faktor G-CSF vyvolává v kostní dřeni zvýšenou produkci granulocytů a zvyšuje influx PMN do napadeného místa. **AM** – alveolární makrofágy, **PMN** – polymorfnukleární leukocyty, **G-CSF** – faktor stimulující kolonie granulocytů, **TNF** – faktor nádorové nekrózy, **IFN** – interferon, **IL** – interleukin, **MIP** – makrofágový zánětlivý protein. Obrázek převzat a upraven.²

- **IL-12**

Interleukin-12 je dalším důležitým cytokinem vyvolávajícím zánětlivé reakce. Jedná se o heterodimerní protein složený ze dvou podjednotek. Interleukin-12 se podílí nejen na specifických imunitních reakcích způsobených viry, mykobakteriemi, houbovitými mikroorganismy a parazity, ale také podporuje vrozené imunitní reakce způsobené gramnegativními bakteriemi.^{40–43} Interleukin-12 stimuluje produkci TNF- α a IFN- γ , čímž se nepřímo podílí na aktivaci a chemoatrakci fagocytárních buněk. Inhibice produkce IL-12 pomocí neutralizujícího antiséra vede k potlačení účinků TNF- α a způsobuje kolonizaci nežádoucími patogeny.⁴⁴

- **IL-6**

Prozánětlivý cytokin IL-6 je produkován monocyty, makrofágy, lymfocyty, fibroblasty, a také plicními epiteliálními buňkami. Stimuluje B-lymfocyty ke zrání na plazmatické buňky a k produkci imunoglobulinů (Ig), T-lymfocyty k růstu a diferenciaci a aktivuje NK buňky. Je rovněž potřebným činitelem během procesu zvýšení tělesné teploty a při stresové reakci na podnět, který vede k tvorbě proteinů akutní fáze, jakým je C-reaktivní protein.³³ Vysoké koncentrace IL-6 jsou považovány za prvotní signál přítomného zánětu.⁴⁵

- **IL-8**

IL-8 je významným chemoatraktantem pro neutrofily. Tento chemokin o molekulové hmotnosti 8 kDa je produkován různými typy buněk, např. AM, epiteliálními buňkami a plicními fibroblasty po jejich stimulaci různými cytokiny, např. IL-1 β a TNF- α . Zvýšení koncentrace IL-8 může být vyvoláno působením LPS, např. z bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.^{32,33,46} IL-8 není jen chemoatraktant, ale také významný angiogenní faktor. Na rozdíl od jiných cytokinů si IL-8 ponechává svou biologickou aktivitu v prostředí s významně kolísajícím pH.⁴⁷

- **IL-1 β**

Cytokin IL-1 β o molekulové hmotnosti 17 kDa patří společně s cytokinem IL-1 α a IL-18 do rodiny IL-1 cytokinů. Hlavními producenty IL-1 β jsou makrofágy a epitelální buňky. Je důležitým růstovým faktorem stimulujícím T-lymfocyty a je rovněž nepostradatelný pro sekreci epitelálního hlenu.⁴⁸ Působení prozánětlivého IL-1 β na buňky imunitního systému vyvolává produkci TNF- α , IL-6 a IL-8. Nadměrné množství IL-1 β způsobuje horečku a akutní fázi zánětu.^{49,50}

- **IL-18**

Prozánětlivý cytokin IL-18 patří do rodiny IL-1 a je produkován jako jeden z prvních cytokinů po interakci s mikroorganismem. Jeho působení aktivuje neutrofily a makrofágy k fagocytóze nežádoucího patogenu a k produkci toxických molekul.⁴⁹

- **MIP-1 α**

Chemokin MIP-1 α , neboli makrofágový zánětlivý protein 1 α , je významným chemotaktickým faktorem pro mononukleární fagocyty a mediátorem způsobujícím fibrosu. Zdrojem MIP-1 α jsou makrofágy a epitelální buňky.⁵¹

- **G-CSF**

Faktor stimulující kolonie granulocytů je důležitým růstovým faktorem, jehož produkce, na rozdíl od TNF- α a IL-10, nesouvisí s místem iniciace zánětu. Působí na dvou úrovních: ze systémového hlediska způsobuje proliferaci a uvolnění PMN z kostní dřeně, a z hlediska lokálního aktivuje PMN a zvyšuje jejich influx do respiračního traktu. Plní tak nezbytnou úlohu při udržení stálé hladiny PMN v krvi a rovněž zvyšuje koncentraci neutrofilů během infekce a zánětu. G-CSF zesiluje různé funkce PMN, např. expresi adhezních molekul, chemotaxi, fagocytózu a vnitrobuněčné usmrcení bakterií.⁵² Stimulace mononukleárních fagocytů určitými cytokiny nebo bakteriálními produkty vede k produkci G-CSF. Bylo prokázáno, že AM u pacientů trpících pneumonií produkují G-CSF spontánně, zatímco AM zdravých jedinců tvoří G-CSF až po stimulaci pomocí LPS.⁵³

- **GM-CSF**

Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů je glykoprotein o molekulové hmotnosti 23 kDa. Je důležitým činitelem pro zrání a diferenciaci progenitorů na neutrofilů, eozinofilů, erytrocytů, makrofágů, megakaryocyty a dendritické buňky. GM-CSF také zvyšuje schopnost zralých hematopoetických buněk prezentovat antigen, zesiluje efekt fagocytózy a zvyšuje chemotaxi leukocytů.⁵⁴

- **RANTES**

Chemokin RANTES (z angl. „regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted“ – aktivačně regulovaný protein, exprimovaný a sekretovaný T-lymfocyty) o molekulové hmotnosti 8 kDa je produkován T-lymfocyty, epiteliálními buňkami, fibroblasty a krevními destičkami. Je průvodním znakem zánětu a způsobuje infiltraci leukocytů do místa zánětu.⁵⁵

- **GRO-KC**

Cytokin GRO-KC (z angl. „growth-regulated oncogene/keratinocyte chemoattractant“ – růstový onkogen/atraktant keratinocytů), patří do rodiny CXC chemokinů a je produkován makrofágy, neutrofilů a epiteliálními buňkami. Rodina chemokinů typu CXC se vyznačuje přítomností dvou cysteinů na N-terminálním konci, které jsou od sebe odděleny jednou aminokyselinou. Odtud plyne označení CXC chemokiny. GRO-KC je důležitým chemoatraktantem pro neutrofilů.⁵⁶

1.1.2 Adaptivní respirační imunita

Adaptivní, specifická imunita je evolučně mladší, než vrozená imunita. Průběh reakcí specifické imunity je v porovnání s vrozenou mnohem delší, jednotlivé procesy trvají dny až týdny a jsou podmíněny předchozím kontaktem organismu s antigenem. V důsledku vytvoření tzv. „imunologické paměti“ jsou komponenty adaptivní imunity při opakovaném kontaktu s daným antigenem schopné reagovat vysoce specificky. Adaptivní imunita je tvořena dvěma základními složkami: buněčnou a humorální imunitou.³⁰

1.1.2.1 Respirační imunita zprostředkovaná buňkami

Lymfocyty typu T a B tvoří základní složku adaptivní imunity. Vývoj B- a T-lymfocytů začíná z kmenových buněk v kostní dřeni, ze které pod vlivem různých faktorů vzniká, kromě myeloidního, také lymfoidní progenitor. Další diferenciaci vznikají NK buňky a progenitory B- a T-lymfocytů.

• B-lymfocyty

Vývoj B-lymfocytů je ukončen setkáním s určitým antigenním epitopem ve slezině, Peyerových plátech, nebo lymfatických uzlinách. Zralý B-lymfocyt se mění na plazmatickou buňku, která je schopna aktivní produkce protilátek (imunoglobulinů) IgG, IgA, IgM, IgD a IgE.³⁰ Ty se mohou vyskytovat buď jako receptory vázané v membráně B-lymfocytů, nebo v rozpustné formě jako sekretované imunoglobuliny v krevním séru a tkáních. IgM a IgD jsou nejčastějším typem povrchových receptorů B-lymfocytů. Lymfocyty typu B se v BAL vyskytují jen velmi zřídka.⁵⁷ Kromě produkce protilátek se mohou B-lymfocyty chovat jako buňky prezentující antigen (APC z angl. „antigen-presenting cells“), produkující IgE a cytokiny. IgE aktivuje žírné buňky a basofily, které uvolňují histamin, komponentu iniciující alergické reakce.^{30,58}

• T-lymfocyty

Vývoj T-lymfocytů probíhá v thymu, některé subpopulace se však mohou vyvíjet i mimo něj. Po dozrání v thymu vznikají dva hlavní prekursorzy T-lymfocytů: pomocné T-lymfocyty Th s povrchovým receptorem CD4 a cytotoxické T-lymfocyty Tc s povrchovým receptorem CD8. Prekursorzy se po setkání s antigenem mění na zralé Th, resp. Tc lymfocyty. Pro pomocné T-lymfocyty Th je typická produkce řady cytokinů, které regulují další buňky, zatímco Tc lymfocyty vykazují cytotoxickou aktivitu vůči jiným buňkám.³⁰

Pomocné T-lymfocyty se dělí do dvou tříd: Th1 a Th2. Th1 zajišťují imunitu vůči patogenům a Th2 podněcují alergický zánět. Pomocné Th1 lymfocyty produkují IFN- γ , IL-2 a TNF- β , zatímco Th2 lymfocyty sekretují širší škálu cytokinů, např. IL-4,

IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. Cytokiny IL-4 a IL-13 stimulují B-lymfocyty k produkci IgE.⁵⁹

T-lymfocyty rozeznávají MHC II a MHC I glykoproteiny (z angl. „major histocompatibility complex“ – hlavní histokompatibilní komplex) na povrchu buněk. MHC I glykoproteiny se vyskytují na povrchu všech jaderných buněk, zatímco MHC II glykoproteiny pouze na APC buňkách.³⁰ T-lymfocyty rozpoznávají určitý antigenní epitop pomocí TCR (z angl. „T-cell receptor“ – receptor T-lymfocytů). Kontakt s antigenním epitopem stimuluje Th k produkci cytokinů, navozuje diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky, způsobuje produkci Tc a Th nesoucích TCR specifický pro daný antigen a aktivuje cytotoxické vlastnosti Tc buněk.⁵⁷

Jak již bylo zmíněno, část zralých B- i T-lymfocytů se díky setkání s antigenem diferencuje na paměťové buňky, které se při dalším střetnutí se stejným antigenem rychle aktivují a spustí tzv. sekundární odpověď, jejíž průběh je mnohem rychlejší, než průběh odpovědi primární. Během celého procesu diferenciaci podstupují B- i T-lymfocyty náhodné přeskupování genů, které kódují jejich variabilní specifické receptory. Po vyloučení autoreaktivních klonů vzniká obrovská škála lymfocytů, specifických pro velké množství antigenů.³⁰

1.1.2.2 Respirační imunita zprostředkovaná protilátkami

Protilátky neboli imunoglobuliny tvoří humorální složku adaptivní imunity. Jejich funkcí je neutralizace infekčních biologických agens prostřednictvím specifických interakcí s antigenním epitopem. Tyto procesy způsobují aktivaci komplementu, opsonizaci a indukci cytotoxicity.

Mezi protilátky respiračního systému patří hlavně imunoglobuliny typu A a G (IgA a IgG). IgA se vyskytuje ve vysoké koncentraci v BAL, kde tvoří dimery i trimery. Monomer IgA je tvořen dvěma lehkými a dvěma těžkými proteinovými řetězci, které jsou propojeny disulfidickými vazbami. Tyto monomery jsou navzájem propojeny do polymeru pomocí sekreční komponenty a spojovacího proteinu J (viz Obr. 3, str. 33, IgA). Sekreční komponenta je v podstatě část povrchového receptoru plicních epitelálních buněk, který slouží k vazbě volných IgA monomerů a jejich přenosu do cytoplasmy. Navázané

molekuly IgA podstupují endocytosu společně s receptorem, jehož jedna část se odštěpí a druhá zůstává součástí dimeru IgA. Tato reakce umožňuje transport molekul IgA přes cytoplasmu epitelálních buněk na mukosální povrchy bez nežádoucích proteolytických reakcí.⁵⁷

Hlavní biologickou funkcí IgA je neutralizace virů a bakterií, které konstantně útočí na mukosální povrchy a usilují o průnik do vnitřních tkání. IgA tyto agens obklopují a usnadňují jejich eliminaci prostřednictvím mukociliární „clearance“ nebo makrofágové fagocytózy. Důležitou skutečností je, že samotné IgA nespouští komplement, který způsobuje zánětlivé reakce a narušení sliznice.³⁰

1.2 Imunologie zánětlivého procesu

Zánět je fyziologickou odpovědí na různé podněty, od infekce až po poranění tkáně. Akutní zánět je provázen imunitními reakcemi s rychlým nástupem a krátkým trváním. Během akutního zánětu vzrůstá hladina určitých plasmatických proteinů, např. C-reaktivní protein, sérový amyloid P a složky komplementu C3 a C4. Při nepřetržitém kontaktu jedince s podnětem se akutní zánět může vyvinout v chronický, který má vážné patologické následky.³⁰

1.2.1 Akutní odpověď organismu na zánět

V raných fázích zánětlivého procesu hraje klíčovou roli infiltrace neutrofilů do napadené tkáně. Ta je nejvyšší přibližně během prvních 6 h probíhajícího zánětu a je doprovázena konstantní produkcí dalších neutrofilů v kostní dřeni. Tělo dospělého zdravého člověka produkuje přibližně 10^{10} neutrofilů denně. Během akutního zánětu se jejich hladina může zvýšit až desetinásobně. Neutrofily po opuštění kostní dřene cirkulují v krevním oběhu. Působení mediátorů akutní fáze, např. histaminu, thrombinu, IL-1 β a TNF- α , zvýší produkci E- a P-selektinu.^{31,60} Cirkulující neutrofily produkují muciny, např. PSGL-1 (z angl. „P-selectin glycoprotein ligand“ – glykoproteinový ligand P-selektinu) nebo oligosacharidové sekvence Sialyl-Lewis-x, které tvoří vazbu s E- a P-selektiny. Tato vazba mucinů na selektiny zachytí volně cirkulující neutrofily

ve vaskulárním endoteliu. Chemokiny (např. IL-8) způsobí konformační změnu adhezních molekul, která vede k migraci neutrofilů skrz endotelium.^{31,61}

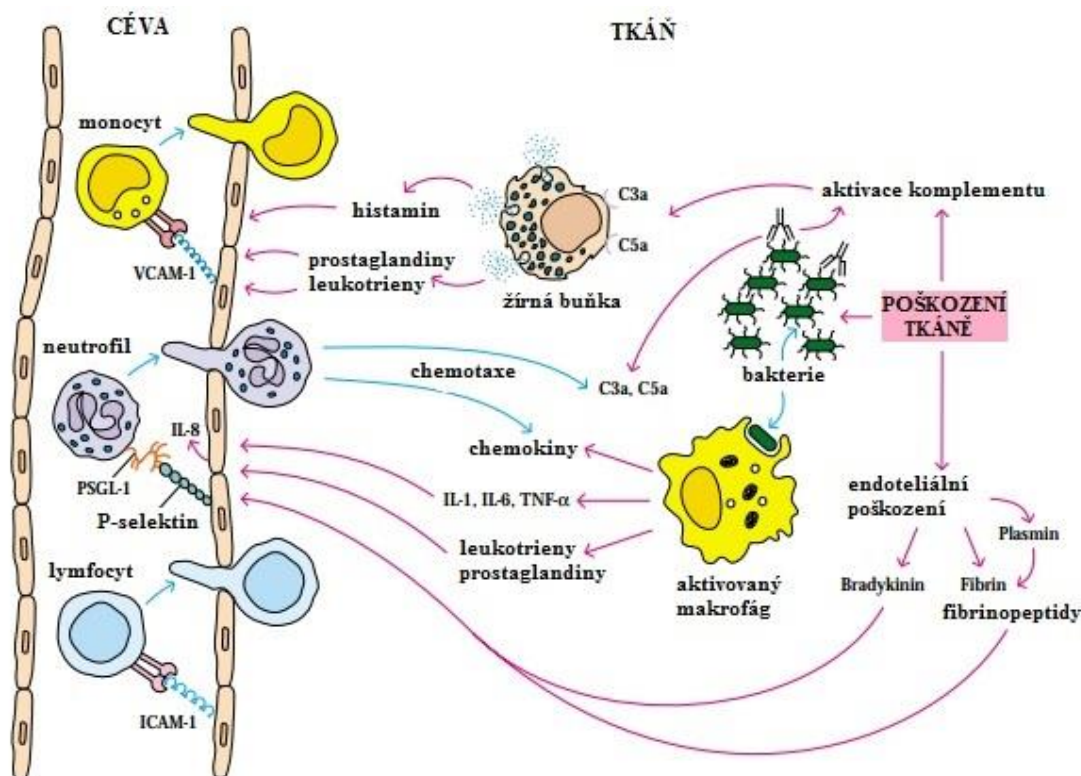
Jakmile se aktivované neutrofilý nachází ve tkáni, zvyšuje se na jejich povrchu počet receptorů pro chemoatraktanty, a neutrofilý jsou chemotakticky přitahovány po směru gradientu příslušného chemoatraktantu (např. odštěpných produktů komplementu C3a a C5a, prostaglandinů, leukotrienů, nebo také formylmethionyl peptidů produkovaných mikroorganismy). Aktivované neutrofilý také zvyšují počet svých povrchových Fc receptorů (z angl. „crystallizable fragment“ – krystalizující fragment) a receptorů pro komplement, a tím umožňují efektivnější vazbu na konstantní doménu protilátek, resp. na komplement, které opsonizují patogen. Aktivační signál rovněž stimuluje metabolickou produkci reaktivních kyslíkových a dusíkatých derivátů, které se společně s mediátory z neutrofilních granulí (proteasami, fosfolipasami, elastasami, kolagenasami) podílejí na eliminaci patogenů.³¹

1.2.1.1 Lokální zánětlivá odpověď

Průvodními jevy lokálního poškození tkáně jsou zduření, zčervenání, bolest a ztráta funkce. Během několika minut dochází k vazodilataci, nahromadění většího objemu krve v okolí místa zánětu a zvýšení propustnosti cév. Dochází ke hromadění tekutin v tkáni, které vede ke srážlivým a zároveň k fibrinolytickým procesům. V určitých případech může docházet k hypersenzitivitě v důsledku nepřímých reakcí na komplementové toxiny C3a, C4a a C5a, které způsobující anafylaxi prostřednictvím lokální degranulace žírných buněk a vyloučením histaminu. Histamin a prostaglandiny zvyšují propustnost cév a vazodilataci. Během několika hodin po započetí cévních změn migruje do tkáně velké množství neutrofilů, které fagocytují přítomné patogeny a uvolňují prozánětlivé mediátory. Mezi tyto mediátory patří MIP, chemoatraktant přitahující makrofágy. Ty přispívají k rozvoji zánětu fagocytózou patogenů a produkcí IL-1 β , IL-6 a TNF- α (viz Obr. 2, str. 27).⁶⁰ TNF- α zvyšuje expresi E-selektinu, IL-1 β zvyšuje expresi ICAM-1 (z angl. „intercellular adhesive molecule“ – mezibuněčná adhezivní molekula) a VCAM-1 (z angl. „vascular cell adhesive molecule“ – cévní adhezivní molekula) na povrchu endoteliálních buněk. Tím se zvyšuje pravděpodobnost zachycení lymfocytů a monocytů

na endoteliálním povrchu a jejich následný transport do místa zánětu. Koncentrace makrofágů v místě zánětu se zvyšuje zhruba 5 – 6 h po spuštění zánětlivých reakcí.

Délka trvání a intenzita lokální zánětlivé odpovědi je přísně regulována. Důležitou roli v reparačních mechanismech hraje růstový faktor TGF- β (z angl. „transforming growth factor“ – transformující růstový faktor), který způsobuje akumulaci a zrání fibroblastů.^{30,31}



Obr. 2: Průběh lokální zánětlivé odpovědi. Poškození tkáně vede k aktivaci komplementu. Její produkty (C3a, C5a) se chovají jako opsoniny, anafylatoxiny a chemotaktické faktory. Bradykinin a fibrinopeptidy způsobují změny v cévní tkáni. Neutrofilů jsou zpravidla prvními leukocyty, které migrují do tkáně. V další fázi je následují monocyty a lymfocyty. Obrázek znázorňuje pouze určité reakce akutní lokální zánětlivé odpovědi. Obrázek převzat a upraven.³¹

VCAM-1 – cévní adhezivní molekula, **PSGL-1** – glykoproteinový ligand P-selektinu, **ICAM-1** – mezibuněčná adhezivní molekula, **IL** – interleukin, **TNF** – faktor nádorové nekrózy, **C3a, C5a** – produkty aktivace komplementu

1.2.1.2 Systémová zánětlivá odpověď

Procesy lokální zánětlivé odpovědi způsobují v pozdějších fázích zánětu systémovou reakci celého organismu. Kombinace cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α vyvolává tvorbu proteinů akutní fáze v játrech. Jedním z těchto činitelů je C-reaktivní protein, jehož koncentrace narůstá až tisícinásobně a jehož funkcí je aktivace komplementu. TNF- α působí na cévní endotelium a makrofágy a stimuluje produkci růstových faktorů G-CSF a GM-CSF. Tyto faktory ovlivňují krvetvorbu a díky ní dochází ke zvyšování počtu leukocytů. Důležitým průvodním jevem systémové odpovědi organismu je zvýšení tělesné teploty.^{30,31}

1.2.2 Chronická odpověď organismu na zánět

Dlouhodobá expozice organismu infekčním agens (např. virům či bakteriím) může vyvolat dlouhotrvající a periodicky se opakující respirační onemocnění, která narušují strukturu plicní tkáně. Dýchací trakt neustále reaguje na nepřetržitý kontakt se zánětlivým podnětem. Některé druhy mikroorganismů se dokáží vyhnout eliminaci imunitním systémem, např. díky ochranné kapsli, která zabraňuje působení komplementu a fagocytóze. Určité součásti imunitního systému i přesto dokáží na přítomnost infekčního činitele reagovat a při stálém působení vyvolávají závažná dýchací onemocnění, jakými jsou astma, chronická bronchitida nebo chronická obstrukční plicní choroba.^{62,63}

Průvodními znaky chronického zánětu je akumulace a aktivace makrofágů, které produkují cytokiny. Pod vlivem těchto faktorů dochází k proliferaci fibroblastů a produkci kolagenu. V důsledku těchto přetrvávajících procesů může v místě chronického zánětu vzniknout zjizvená tkáň. Tento jev se nazývá fibrosa a výrazně narušuje funkci zdravé tkáně.³¹

Imunitní buňky přítomné při akutním zánětu nejsou stejného typu, jako buňky vyskytující se u zánětu chronického. Akutní zánět se vyznačuje mobilizací velkého počtu neutrofilů a Th buněk, zatímco chronický zánět vykazuje vyšší koncentraci makrofágů, Tc buněk a B-lymfocytů.⁶⁴

Klíčovou roli při chronickém zánětu plní cytokin IFN- γ produkováný Th1, Tc a NK buňkami a cytokin TNF- α sekretovaný makrofágy. Působení IFN- γ podněcuje

makrofágy k vyšší expresi MHC II na svém povrchu, stimuluje produkci cytokinů (zejména TNF- α) a zvyšuje antimikrobiální aktivitu. Vzhledem k velkému množství makrofágů přítomných při chronickém zánětu je jejich aktivita mnohem intenzivnější a způsobuje poškození okolní tkáně. Oba cytokiny, TNF- α i IFN- γ , zvyšují expresi adhezních molekul ICAM-1 a E-selektinu a mají přímý vliv na infiltraci dalších imunitních buněk do místa zánětu.³¹

Značně rozšířenou civilizační chorobou, která je provázena chronickým onemocněním plic, je astma. Průvodními symptomy astmatu jsou záchvaty kašle, sípání, ztížené dýchání a nadměrná plicní reaktivita. Astma je modulováno působením široké škály cytokinů, např. IL-1, IL-8, TNF- α , IL-17, IL-18, RANTES, GM-CSF a VEGF (z angl. „vascular endothelial growth factor“ – vaskulární endoteliální růstový faktor).⁶⁵ Vzhledem k tomu, že je LPS bakteriálním endotoxinem, jeho role je pro vyvolání astmatu klíčová.⁶⁶ Bylo prokázáno, že u myší, senzitizedovaných ovalbuminem (OVA), způsobila inhalace LPS prohloubení zánětlivé odpovědi.⁶⁷ V dalších studiích byly naopak zkoumány vlivy čtyřtýdenní inhalace OVA bez přítomnosti LPS po předchozí intraperitoneální senzitizaci OVA. Po ukončení experimentu byla provedena BAL a histologické vyšetření, které pouze prokázaly vyvolání akutní zánětlivé odpovědi. Chronické změny plic vyvolávající zánět nebyly pozorovány.⁶⁸

Na druhou stranu existuje mnoho studií, zkoumajících vliv inhalace vzduchu, kontaminovaného různými druhy antigenů (imunogenů). Jedná se především o výzkumy zaměřené na pracovníky v oboru zemědělství, mlékárenství a zaměstnance v oboru zpracování bavlny nebo laminátu, kteří přichází do každodenního styku s antigeny (imunogeny). U těchto pracovníků bylo prokázáno narušení plicní tkáně a přítomnost obstrukce, zánětu a nadměrné imunitní odpovědi plic.^{69–72}

1.3 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa je autosomálně recesivní onemocnění rozšířené v bělošské populaci. Je nejčastěji způsobeno mutací $\Delta F508$ (delecí aminokyseliny fenylalaninu v pozici 508) genu pro CFTR (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ – transmembránový regulátor cystické fibrosy), který je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 7. CFTR je glykoprotein umožňující přenos chloridových iontů

na apikální stranu epitelálních buněk. U pacientů trpících CF může být CFTR defektní, redukován, nebo zcela chybět. Porucha v syntéze CFTR narušuje transport chloridových iontů a tím i hospodaření s vodou. Výsledkem je sekrece hustého a viskózního hlenu, který brání přirozeným obranným mechanismům v eliminaci bakteriálních patogenů, např. pomocí mukociliární „clearance“. Stálá přítomnost patogenů v respiračním ústrojí vede k chronickému zánětu plic, který je pro pacienty s CF fatální. Systémová sekrece hustého hlenu má také za následek např. pankreatickou insuficienci, vysoký obsah sodných a chloridových iontů v potu a mužskou neplodnost.^{73,74}

Nejčastějšími patogeny, které postihují plíce pacientů s CF, jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*. Časné zasažení respiračního ústrojí nemukoidním kmenem *Pseudomonas aeruginosa* může být v určitých případech vyléčeno, nicméně bakterie v plicích často přetrvává a má tendenci měnit svůj fenotyp na mukoidní, který je rozhodujícím stimulem plicních klinických projevů u pacientů s CF. Mukoidní typ *Pseudomonas aeruginosa* se vyznačuje nadměrnou produkcí polysacharidu alginátu, který plní ochrannou úlohu a je hlavní komponentou bakteriálního biofilmu.^{73,75} I přes zvýšenou produkci protilátek proti *Pseudomonas aeruginosa*, které lze detekovat v krvi, není imunitní systém hostitele schopen účinné eliminace patogenu. Bakterie také tvoří makrokolonie, které nemohou být podrobeny fagocytóze a dalšímu zpracování obrannými mechanismy hostitele.^{73,76}

1.3.1 Zánět plic u pacientů trpících cystickou fibrosou

Charakteristickým ukazatelem zánětu plic u pacientů s CF je vysoká koncentrace PMN v dýchacích cestách. Transport PMN je řízen jak hostitelskými, tak bakteriálními chemokiny, např. rozpustnými bakteriálními produkty, fragmenty komplementu a cytokiny, především IL-8. Zvýšená koncentrace IL-8 je pozorována ve sputu, BAL a krevním séru. Další cytokiny, především IL-1, TNF- α a IL-6, jsou rovněž detekovány ve zvýšené míře ve sputu a BAL.

Vysoká koncentrace chemoatraktantů a zánětlivých mediátorů způsobuje konstantní influx PMN. Ty produkují zvýšené množství elastasy, enzymu, který přímo přispívá k degradaci plicní tkáně. Elastasa neutrofilů narušuje strukturní proteiny, jakými jsou elastin, kolagen a proteoglykany, dále štěpí imunoglobuliny, komponenty

komplementu a opsonizační receptory na povrchu fagocytů, např. CR1 (z angl. „complement receptor 1“ – komplementový receptor 1). Společně s dalšími vedlejšími efekty má elastasa neutrofilů za následek narušení mukociliární „clearance“. Přítomnost elastasy také stimuluje epiteliální buňky k produkci IL-8. Tento chemokin vyvolává influx dalších PMN do plic, a tím prohlubuje zánět.⁷³

Existuje několik možností léčby plicního zánětu pacientů s CF, většina je ale doprovázena vedlejšími účinky nebo vymizením léčebného efektu po jejich vysazení. Jedná se např. o podávání kortikosteroidů, ibuprofenu nebo azithromycinu. Terapie antibiotiky patří mezi nejrozšířenější způsob léčby. Z dlouhodobého hlediska je však podávání antibiotik úzce spjato s vytvořením bakteriální rezistence a zvyšující se dávky léčiva neprospívají zdravotnímu stavu pacienta. Velmi pozitivní výsledky byly pozorovány při orálním podávání slepičích protilátek, zejména protilátek produkovaných proti *Pseudomonas aeruginosa*. Byly provedeny studie, které potvrzují účinek slepičích protilátek v kombinaci s antibiotiky. Tento způsob podávání léčiv pomohl oddálit nástup chronického zánětu a také vedl k prevenci bakteriální kolonizace.^{74,77} V odborné literatuře jsou publikovány zejména studie zaměřené na orální podání IgY produkovaných proti *Pseudomonas aeruginosa*. Inhalační podání zůstává předmětem dalšího zkoumání.

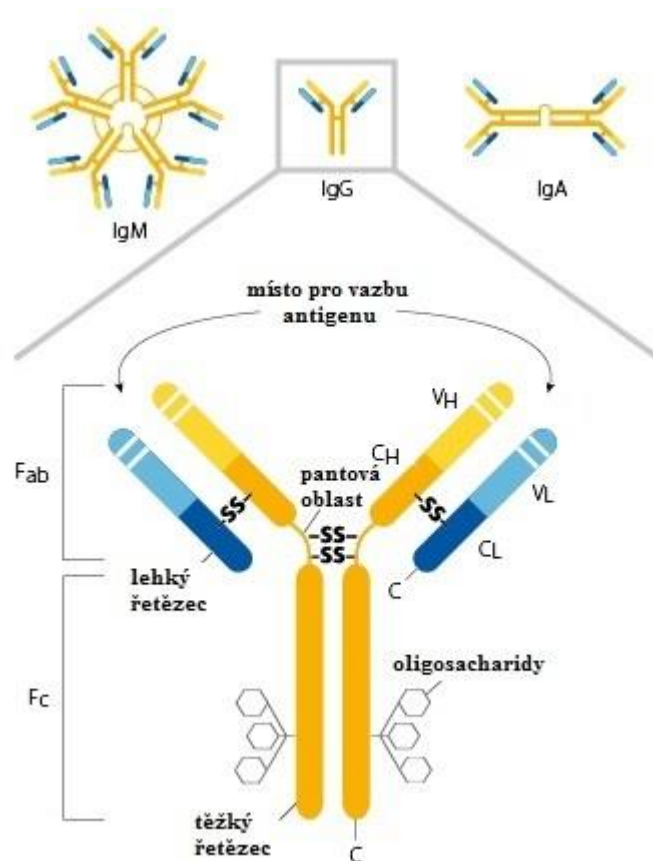
1.4 Protilátky

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1.2.1 Respirační imunita zprostředkovaná buňkami, str. 23, protilátky neboli imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které se v imunitním systému vyskytují ve dvou formách: jako receptory B-lymfocytů vázané v membráně a v rozpustné formě jako sekretované imunoglobuliny přítomné v krevním séru a tkáních. Oba typy jsou shodné jak ve své struktuře, tak ve funkci.

1.4.1 Savčí protilátky

Imunitní systém savců produkuje pět tříd imunoglobulinů: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. Jednotlivé třídy se od sebe vzájemně liší svou velikostí, nábojem a aminokyselinovým a sacharidovým složením. IgG a IgA lze dále rozlišit na jednotlivé podtřídy. Všechny třídy a podtřídy tvoří dohromady 9 isotypů.⁶⁴

Molekulová hmotnost imunoglobulinů se pohybuje v rozmezí 146 – 970 kDa a jejich strukturu znázorňuje Obr. 3, str 33. Protilátky jsou bifunkční molekuly tvořené dvěma těžkými (H – z angl. „heavy“) a dvěma lehkými řetězci (L – z angl. „light“). Těžké řetězce jsou vzájemně propojeny disulfidickými (cystinovými) můstky. Součástí těžkých řetězců je tzv. pantová oblast (z angl. „hinge region“), která uděluje určitou flexibilitu části imunoglobulinu specifické pro antigen. Ke každému těžkému řetězci je disulfidickým můstkem připojen kratší, lehký řetězec. Těžké a lehké řetězce se skládají ze dvou hlavních domén: variabilní (V – z angl. „variable region“) a konstantní (C – z angl. „constant region“) domény. Variabilní doména je součástí tzv. Fab fragmentu (z angl. „antigen binding fragment“ – antigen vázající fragment) a umožňuje specifickou vazbu na antigen. Konstantní doménu tvoří Fc fragment, kde se nachází místo zodpovědné za aktivaci komplementu a interakci s receptory pro Fc. Těžké řetězce jsou ve své Fc části glykosylovány. Fragменты Fab a Fc lze získat proteolytickým štěpením, což bylo poprvé prokázáno anglickým vědcem Rodney R. Porterem, který v r. 1972 získal Nobelovu cenu za určení chemické struktury imunoglobulinů. Pro jejich studium využil enzym papain, který je schopný štěpit imunoglobulin na Fab a Fc fragment.^{30,64,78,79}



Obr. 3: Struktura imunoglobulinu. IgM tvoří pentamer, IgA dimer. IgG je složeno z těžkých a lehkých řetězců, z nichž lze proteolyticky připravit Fab a Fc fragment. Fab umožňuje specifickou vazbu na antigen. Těžké řetězce jsou spojeny pantovou oblastí. Fc část těžkých řetězců je glykosylována. Disulfidická vazba umožňuje vzájemné spojení jednotlivých řetězců. **IgM** – imunoglobulin typu M, **IgG** – imunoglobulin typu G, **IgA** – imunoglobulin typu A, **Fab** – antigen vázající fragment, **Fc** – krystalizující fragment, **C** – konstantní doména, **CL** – lehký řetězec konstantní domény, **CH** – těžký řetězec konstantní domény, **VL** – lehký řetězec variabilní domény, **VH** – těžký řetězec variabilní domény. Obrázek převzat a upraven.⁸⁰

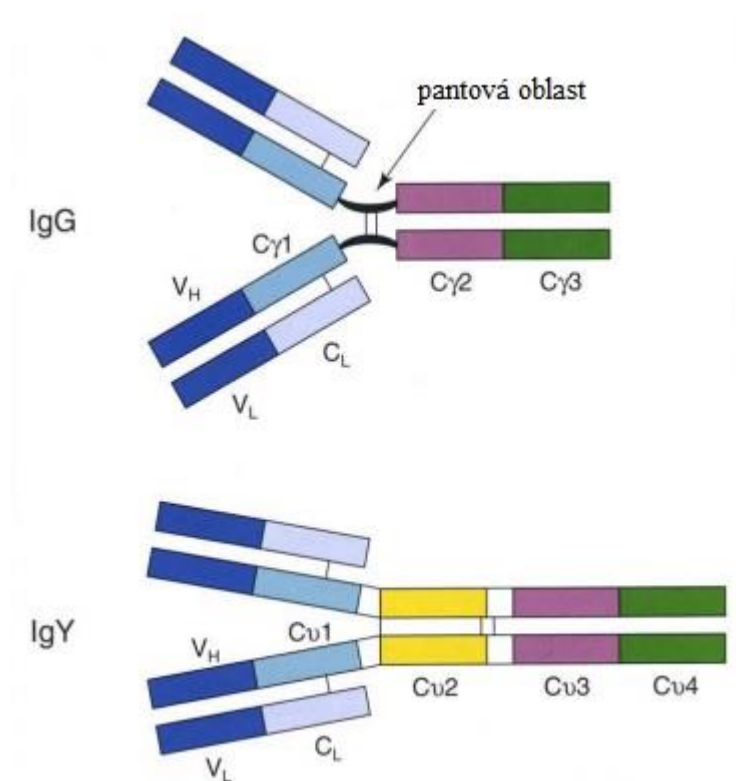
1.4.2 Slepičí protilátky

Slepičí protilátky jsou z funkčního hlediska ekvivalentní savčím protilátkám, v několika ohledech ale vykazují jisté odlišnosti. Imunitní systém slepic produkuje tři druhy imunoglobulinů: IgA, IgM a IgY. Slepičí IgA a IgM jsou podobné savčím ekvivalentům, IgY funkcí odpovídá savčímu IgG a tvoří 75 % celkového obsahu

imunoglobulinů. Koncentrace IgY v séru je přibližně 5 mg/ml. IgY je v nejvyšším množství přítomen ve vaječném žloutku, kde dosahuje koncentrace 5 – 25 mg/ml. Sérový IgY je selektivně přenášen do žloutku přes specifický receptor pro IgY na povrchu žloutkové membrány.⁸¹

Struktura slepičího IgY je navzdory funkční podobnosti lidskému IgG odlišná (viz Obr. 4, str. 35). IgY je složen ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. Molekulová hmotnost celého IgY je 180 kDa. Těžký řetězec se skládá z pěti domén: jedné variabilní domény V_H a čtyř konstantních domén $C_{\nu}1 - C_{\nu}4$. Slepičí IgY nemá pantovou oblast. Předpokládá se, slepičí doméně $C_{\nu}2$ odpovídá právě savčí pantová oblast. Fc fragment slepičích IgY nese rovněž oligosacharidy, připojené pomocí asparaginu, jedná se však o sacharidy s odlišnou strukturou.⁸¹

Slepičí IgY je v mnoha ohledech výhodnější, než savčí IgG získaný tradiční cestou, např. z králíčího séra. Díky pravidelné produkci slepičích vajec (přibližně 280 ks ročně) a vysokému obsahu IgY ve žloutku (100 – 150 mg/vejce) je možné získat přibližně 40 g IgY z jedno produkčního zvířete ročně, což je 5x – 10x více, než jaké množství IgG lze získat ze séra jednoho králíka.^{81,82} Purifikace polyklonálního slepičího IgY ze žloutku je jednodušší, než příprava protilátek z krve produkčních savců. Slepičí vejce obsahuje pouze jeden druh imunoglobulinů, IgY, a tím se postup velmi zjednodušuje. Slepičí IgY neaktivuje savčí komplement a rozeznává širší škálu epitopů, než savčí IgG. Specifita IgY k antigenům je srovnatelná se specifitou IgG. Sběr vajec je neinvazivní v porovnání s odběrem krve savců a pro produkční zvíře je méně stresující. Chov slepic je navíc v porovnání s chovem savců levnější a sběr vajec nevyžaduje kvalifikovaného pracovníka.



Obr. 4: Rozdíl ve struktuře IgG a IgY. Těžký řetězec IgG se skládá ze čtyř domén, těžký řetězec IgY je tvořen pěti doménami. Předpokládá se, že pantovou oblast, která se vyvinula u savčího IgG, nahrazuje konstantní doména C_{v2} IgY. **IgG** – imunoglobulin G, **IgY** – imunoglobulin Y, **V_H** – variabilní doména těžkého řetězce, **V_L** – variabilní doména lehkého řetězce, **C_L** – konstantní doména lehkého řetězce, **C_{v1} – C_{v4}** – konstantní domény těžkého řetězce IgY, **C_{γ1} – C_{γ3}** – konstantní domény těžkého řetězce IgG. Obrázek převzat a upraven.⁸³

Díky mnoha výhodám mají slepičí protilátky široké pole působnosti, např. v imunoterapii. V dnešní době, kdy je mnoho bakteriálních kmenů resistantních vůči antibiotikům, nabízí podání slepičích protilátek jako prostředku pasivní imunizace významnou možnost v léčbě bakteriálních infekcí.⁸¹

1.4.3 Afinita a avidita protilátek k antigenu

Afinita protilátky k antigenu je dána interakcí Fab části imunoglobulinu s epitopem na daném antigenu. Na koncích Fab části imunoglobulinu se vyskytují tzv. hypervariabilní úseky, které tvoří unikátní strukturu (paratop). Toto uspořádání je komplementární k určité struktuře antigenu (epitopu).

Spojení paratopu a epitopu se uskutečňuje pomocí nekovalentních interakcí (vodíkových vazeb, van der Waalsových sil, elektrostatických interakcí a hydrofobního efektu). Každá z vazeb je sama o sobě mnohem slabší, než kovalentní vazba, ale dohromady tvoří interakci velmi silnou. K uskutečnění vazebné kombinace paratopu a epitopu je zapotřebí vhodná prostorová komplementarita, rozdělení náboje a schopnost tvořit vodíkové vazby. Vazba mezi antigenem a protilátkou je i přes velmi nízkou hodnotu disociační konstanty reversibilní.

Vzhledem k tomu, že jsou imunoglobuliny složené ze čtyř polypeptidových řetězců tvořících dvě vazebná místa pro antigen, jsou potenciálně multivalentní a mohou vázat více antigenů. Antigeny můžeme rozdělit na monovalentní (např. malé molekuly hapteny) a multivalentní (např. mikroorganismy). Síla, kterou se multivalentní protilátka váže na multivalentní antigen, se nazývá avidita, na rozdíl od afinity, která je definována jako síla vazby univalentního fragmentu protilátky k jedné antigenní determinantě. Desetivalentní molekuly IgM se tedy mohou vázat velmi silně (s velkou aviditou) např. na bakteriální povrch s velkým počtem blízkých identických antigenních míst, přestože afinita jednotlivých vazebných míst k epitopům je nízká. Avidita protilátky k určitému antigenu závisí na afinitách jednotlivých vazebných míst k epitopům antigenu. Výsledná avidita je však větší, než součet jednotlivých afinit.^{30,64}

1.4.4 Antigenicita a imunogenicita antigenu

Imunogenicita a antigenicita spolu úzce souvisí, jedná se ale o odlišné termíny. Imunogenicita je schopnost vyvolat humorální a/nebo buněčnou imunitní odpověď (např. kontakt B-lymfocyту s antigenem vede ke vzniku paměťového B-lymfocyту a zralého B-lymfocyту, tedy plazmatické buňky). Molekuly, které vyvolávají specifické imunitní reakce, se běžně nazývají antigeny, ačkoliv vhodnějším termínem je imunogen.

Antigenicita je schopnost specifické kombinace určité molekuly s konečnými produkty imunitních reakcí (např. protilátkami a/nebo povrchovými receptory). Lze tvrdit, že všechny molekuly vykazující imunogenicitu, mají také schopnost antigenicity. Opačně ale tvrzení neplatí. Výjimkou jsou pouze hapteny, malé molekuly, které jsou antigenní, ale samy o sobě postrádají schopnost vyvolávat specifické imunitní reakce. Jinými slovy postrádají imunogenicitu.³¹

2 Cíl práce

Účelem této práce je zjistit možný zánětlivý vliv slepičích imunoglobulinů typu Y a z nich připravených Fab fragmentů na respirační trakt prostřednictvím jejich inhalačního působení na potkany kmene Wistar. Pro dosažení tohoto cíle bylo zapotřebí splnit tyto dílčí úkoly:

- enzymově rozštěpit IgY a ze směsi štěpných produktů oddělit Fab fragment pomocí chromatografické separace na iontoměniči
- vystavit potkany kmene Wistar každodenní dlouhodobé inhalační expozici IgY, Fab fragmentů a OVA a před započítím experimentu odebrat vzorek krve
- po ukončení inhalační expozice odebrat vzorek krve, BAL a izolovat plicní orgán
- v krevním séru experimentálních zvířat, získaného před započítím a po ukončení pokusu, stanovit přítomnost specifických protilátek proti inhalovaným antigenům metodou ELISA pro potvrzení efektivního průběhu inhalační expozice
- imunochemicky stanovit koncentraci zánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a faktoru GM-CSF v BAL a krevním séru exponovaných zvířat pro objasnění imunogenicity testovaných látek
- provést histologické vyšetření respirační tkáně a cytologickou analýzu BAL za účelem sledování zánětlivých změn plicního parenchymu
- v kontrolním expozičním pokusu vystavit buňky linií A549, NuLi-1 a CuFi-1 identickým testovaným látkám a účinnému stimulantu produkce zánětlivých cytokinů
- imunochemicky analyzovat koncentraci sekretovaných cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a faktoru GM-CSF v buněčném médiu

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie a materiál

Biochrom

FBS, gentamycin

Bio-Rad

souprava pro detekci lidských cytokinů „Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay“, souprava pro detekci potkaních cytokinů „Bio-Plex Pro Rat Cytokine Group I 8-plex Assay“

Biosystems

H₂SO₄, TMB

DiaPath

formaldehyd – neutrální formalín (pH 7,2 – 7,4)

Fluka

Coomassie Brilliant Blue R-250, L-alanin, L-asparagin, L-asparagová kyselina, merkaptoethanol, Tween 20

Gibco

geneticin

ICL Lab

kozí protilátka proti slepičímu Fab fragmentu, „anti-Fab: Affinity Purified Goat anti-Chicken IgY Fab“

Lach-Ner

KCl, KH₂PO₄

Lachema

bromfenolová modř, CH₃COOH, EDTA, ethanol, glycerol, glycin, HCl, KH₂PO₄, L-cystein, methanol, Na₂CO₃, NaCl, NaHCO₃, ovalbumin, peroxodisíran amonný

Laktino

odtučněné sušené mléko

Lonza

souprava BEGM („Bronchial Epithelial Cell Growth Medium“) – médium BEBM („Bronchial Epithelial Basal Medium“) se suplementy a růstovými faktory: BPE (z angl. „bovine pituitary extract“ – extrakt hovězí hypofýzy), hEGF (z angl. „human endothelial growth factor“ – lidský endoteliální růstový faktor), hydrokortison, epinefrin, transferin, insulin, retinová kyselina, trijodthyronin)

PAA Laboratories

médium DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“), L-glutamin, trypsin-EDTA

Penta

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, NaN_3 , NaOH

Pharmacia

konkanavalin A, nosič DEAE-Sephacel

Santa Cruz Biotechnology

slepičí protilátka proti kozímu IgG s konjugovanou alkalickou fosfatase „Chicken anti-goat IgG-AP“

Serva

akrylamid, BIS, SDS, TEMED, TRIS, Triton X-100

Sigma

BSA, DTT, imunoglobulin typu G izolovaný z kozího krevního séra (gIgG), imunoglobulin typu G izolovaný z lidského krevního séra (hIgG), kolagen (typ IV – izolovaný z lidské placenty), kozí protilátka proti potkanímu IgG s konjugovanou peroxidase „Anti-Rat IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat“, LPS, peroxidasa, tableta „SigmaFast 3,3'-diaminobenzidine“, tableta „SigmaFast BCIP/NBT“

ostatní

A549 – buňky lidského adenokarcinomu (poskytnuto prof. I. Střížem z Oddělení klinické a transplantační imunologie Institutu klinické a experimentální medicíny IKEM), imunoglobulin typu Y (IgY) izolovaný ze slepičího vaječného žloutku z komerčních vajec (poskytnuto prof. P. Hodkem), jodacetamid, králíčí protilátka proti slepičímu IgY s konjugovanou peroxidase („Rachi: anti-IgY rabbit anti-Chicken-Px“), papain, voda (destilovaná, sterilní, demineralizovaná)

3.2 Modelové organismy

ATCC

CuFi-1 – imortalizované lidské plicní epitelální buňky (pacient s CF)

NuLi-1 – imortalizované lidské plicní epitelální buňky (zdravý pacient)

Velaz

potkani kmene Wistar

3.3 Použité pomůcky

Amicon

ultrafiltrační zařízení (membrána PM 30)

Chirana

injekční stříkačky (různé objemy)

Corning

24-jamkové destičky (povrch „CellBIND“), kultivační lahve 25 cm² a 75 cm², sterilní filtry 0,22 µm

Millipore

membrána PVDF („Immobilon Transfer Membranes“), souprava „Muse Count & Viability Kit“

Novagen

dialyzační aparatury „D-Tube Dialyzer Maxi 6 – 8 kDa“

Thermo Scientific

moduly pro 96-jamkový rám „NUNC PolySorp, UNFRA F16“, standard „Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder“

Whatmann

filtrační papír „Whatmann No.3“

3.4 Použité přístroje

Amersham Pharmacia Biotech

zdroj EPS 301

ATI Orion

pH metr, model 370

Bio-Rad

analyzátoři Bio-Plex 200 (program Bio-Plex Manager 6.0) a Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (program Luminex XPONENT 4.2 a Bio-Plex Manager 6.1)

Biometra

aparatura pro horizontální elektropřenos

ČSAV, Vývojové dílny

třepačka

Eppendorf

centrifuga 5415 R

Gilson

minicentrifuga GmCLab

Hermle

centrifuga Z 323 K

Hettich

centrifuga Universal 320 R

Hofer

aparatura pro elektroforézu mini TE

IKA

magnetická míchačka KMO 2 BASIC

Kern

předvážky EW 600

Labox

laminární boxy Bio 126 a MB 126

Millipore

analyzátor buněk „Muse Cell Analyzer“

MLW

centrifuga T52.2

Mom Budapest

spektrofotometr Spektromom 195 D

Motic

mikroskop AE 31

Nikon

mikroskopy Eclipse TE2002-U a Eclipse 6400 (program NIS-Elements AR 2.30)

Ohaus

analytické váhy Discovery

Pari

inhalátor a nebulizátor Pari Boy 037G 6000

Sanyo

centrifuga Micro Centaur

Tecan

spektrofotometr Sunrise, program XRead Plus

VWR

centrifuga MicroStar 12

3.5 Použité metody

3.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace IgY

Před samotným štěpením IgY a také v dalších fázích experimentu bylo potřeba provést stanovení koncentrace imunoglobulinu.

Použité roztoky:

- *PBS-ELISA + azid*: 0,134 M NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, 0,1% (w/v) NaN₃; pH = 7,2

Dle potřeby bylo z roztoku měřeného vzorku odebráno dostatečné množství (min. 500 µl) do mikrozkuhavky a centrifugováno 10 min při 13 000 RPM (Micro Centaur). Supernatant byl pipetován do křemenné kyvety s délkou optické dráhy 0,201 cm a v případě potřeby ředěn uchovávacím roztokem PBS-ELISA + azid, nebo příslušným dialyzačním pufrem, který byl zároveň použit jako slepý vzorek. Byla proměřena absorbance při 280 nm (A_{280} , Spektromom). Koncentrace proteinu byla vypočtena dle následujícího vztahu:

$$c = A_{280} \cdot f \cdot n \cdot k$$

kde:

c – koncentrace proteinu [mg/ml]

A_{280} – absorbance při 280 nm

f – empirický faktor pro IgY = 1,094

n – ředění vzorku

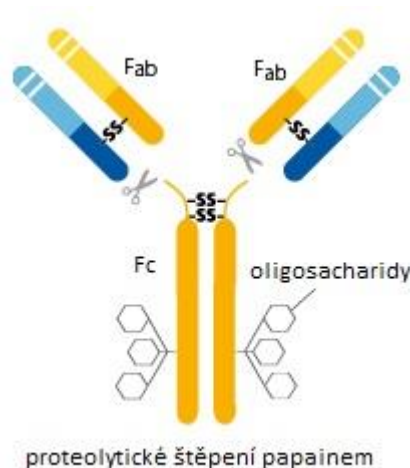
k – faktor pro přepočet délky optické dráhy = 5

3.5.2 Štěpení imunoglobulinů Y (IgY) a separace fragmentů

Pro přípravu dostatečného množství Fab fragmentů bylo potřeba IgY štěpit enzymem papainem a dále efektivně separovat štěpné fragmenty Fab a Fc pomocí chromatografie na iontoměniči.

3.5.2.1 Štěpení IgY enzymem papainem

Pro přípravu Fab byl použit preparát IgY o koncentraci 22,88 mg/ml získaný izolací z komerčně dostupných vajec (Interspar). Pro štěpení IgY (180 kDa) na Fab a Fc fragment byl vybrán enzym papain, který poskytuje tři štěpné produkty (dva Fab fragmenty o velikosti 44 kDa a jeden Fc fragment o velikosti 55 kDa), viz Obr. 5.⁸⁴



Obr. 5: Schématické znázornění štěpení imunoglobulinu enzymem papainem. Po štěpení IgY enzymem papainem vznikají tři štěpné produkty: dva **Fab** fragmenty (44 kDa) a jeden **Fc** fragment (55 kDa).⁸⁴ Obrázek převzat a upraven.⁸⁵

Použité roztoky:

- *TRIS-HCl*, 50 mM: 0,9% NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM TRIS; pH = 7,4 (titrace 1 M HCl)

V reakční nádobě byl připraven roztok papainu (výsledná koncentrace v reakční směsi 0,028 mg/ml), cysteinu (0,011 mg/ml) a DTT (0,030 mg/ml) ve vypočítaném objemu

TRIS-HCl. Aby došlo k aktivaci papainu, byla směs inkubována při 37°C po dobu 30 min. Poté byl přidán IgY do celkového objemu 120 ml reakční směsi (poměr enzym:substrát 1:23) a směs byla za stálého míchání inkubována při teplotě 37°C po dobu 15 hod. Štěpení bylo zastaveno přidáním jodacetamidu do výsledné koncentrace 15 mM. Směs byla inkubována za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hod.

Štěpný produkt byl analyzován na elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (viz 3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, str. 46).

3.5.2.2 Separace štěpných produktů IgY chromatografií na iontoměniči

Cílem separace bylo oddělit štěpené Fab fragmenty od glykosylovaných Fc fragmentů. Produkty štěpné reakce byly z reakční směsi separovány pomocí chromatografie na iontoměniči. Isoelektrické body separovaných látek se pohybují v rozmezí 5,0 – 5,5 (Fc), resp. nad 6,5 (Fab).⁸⁶ Proto byl zvolen slabý anex, diethylaminoethyl-celulosa (DEAE-Sephacel), kde má funkční skupina kladný náboj v rozsahu pH 2 – 9 a umožňuje zachytit proteiny se záporným nábojem.

Použité roztoky:

- *ekvilibrační pufr*: 10 mM TRIS-HCl, pH = 8,6
- *eluční pufr pro Fab fragment*: 100 mM TRIS-HCl, pH = 8,0
- *eluční pufr pro Fc fragment a kontaminace*: 100 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, pH = 8,0
- *PBS*: 4 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaCl, pH = 7,2
- 0,5 M TRIS-HCl, pH = 8,6
- 1 M NaCl
- 0,4 M NaOH

Štěpný produkt byl nejprve dialyzován přes noc proti ekvilibračnímu pufru za stálého míchání při teplotě 7°C. Pro dosažení vysokého výtěžku separace byly použity čtyři kolony o průměrném objemu 100 ml separačního gelu. Chromatografický gel byl v koloně ekvilibrován přes noc ekvilibračním pufrem, který protékal samospádem. Na kolonu bylo nanášeno v průměru 12 ml štěpného produktu, který byl odmyt ekvilibračním pufrem.

Byla průběžně měřena A_{280} (Spektromom). Pro eluci Fab fragmentu byl nanášen eluční pufr pro Fab a jímány 5 ml frakce. Byla měřena A_{280} , sestaven eluční profil a z frakcí Fab 2, Fab 6, Fab 7 a Fab 8 byly odebrány reprezentativní vzorky pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS. Frakce Fab 2 – Fab 5 byly spojeny a zahuštěny na koncentraci 2,6 mg/ml. Pro eluci Fc fragmentu byl použit eluční pufr pro Fc a jímány 5 ml frakce. Byla měřena A_{280} a z frakcí Fc 11, Fc 12 a Fc 13 byly odebrány reprezentativní vzorky pro elektroforézu v prostředí SDS.

Regenerace gelu probíhala v pěti krocích: gel byl inkubován v 1 M NaCl po dobu 5 min. Následovalo promytí destilovanou vodou, inkubace v 0,4 M NaOH po dobu 5 min, promytí destilovanou vodou a inkubace v 0,5 M TRIS-HCl, pH = 8,6. Všechny kroky probíhaly při laboratorní teplotě. Poté byl gel v závislosti na dalším postupu buď ekvilibrován v ekvilibračním pufru, nebo uchován ve 20% ethanolu při 4°C pro zamezení mikrobiálního růstu.

3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS je rozsáhle využívaná technika k separaci nabitých molekul podle jejich relativní molekulové hmotnosti, resp. míry pohyblivosti v elektrickém poli. Prostředí SDS denaturuje proteiny a uděluje jim záporný náboj. Ty pak putují ke kladné elektrodě (anodě) různou rychlostí. Rychlost pohybu proteinů závisí na jejich velikosti, stupni denaturace, posttranslačních modifikacích a intenzitě elektrického pole. Molekulová hmotnost jednotlivých proteinů v analyzované směsi lze stanovit pomocí vhodně zvolených standardů.⁸⁷

V této práci byla elektroforéza nejen nezbytným krokem pro specifickou detekci proteinů metodou „Western blot“, ale také umožnila objasnit efektivitu vzájemné separace štěpených Fab a Fc fragmentů.

Použité roztoky:

- *pufr A*: 0,375 M TRIS-HCl; 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8
- *polymerační roztok A*: 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufru A
- *pufr B*: 0,125 M TRIS-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,8
- *polymerační roztok B*: 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) BIS, v pufru B

- *vzorkový pufr neredukující*: 0,063 M TRIS-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
- *vzorkový pufr redukující*: 5% (v/v) 2-merkaptoethanol, v neredukujícím vzorkovém pufru
- *APS*: 10% (w/v) peroxodisíran amonný, v destilované vodě
- *elektrodový pufr*: 0,192 M glycin; 0,025 M TRIS, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- *barvicí lázeň*: 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% CH₃COOH
- *odbarvovací lázeň*: 10% (v/v) CH₃COOH, 25% (v/v) ethanol, v destilované vodě

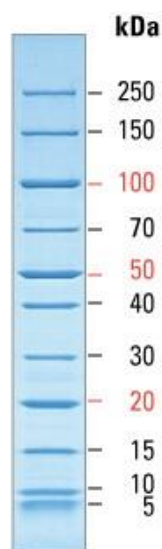
Skla pro elektroforézu byla odmaštěna ethanolem a společně s těsněním vložena do aparatury. V průběhu práce byla hustota gelu průběžně optimalizována. Vhodné složení pro účinnou separaci proteinů prokázal 12% separační gel + 4% zaostřovací gel (redukující prostředí) a 10% separační gel + 4% zaostřovací gel (neredučující prostředí). Složení uvedených gelů je následující:

- *12% separační gel*: 4,5 ml pufr A, 3 ml polymerační roztok A, 7,5 µl TEMED, 75 µl APS
- *10% separační gel*: 5 ml pufr A, 2,5 ml polymerační roztok A, 7,5 µl TEMED, 75 µl APS
- *4% zaostřovací gel*: 2,6 ml pufr B, 400 µl polymerační roztok B, 3 µl TEMED, 60 µl APS, malé množství krystalů bromfenolové modři

Po kontrole kvality těsnění bylo mezi skla pipetováno 6 ml roztoku pro přípravu separačního gelu a převrstveno destilovanou vodou. Polymerace trvala přibližně 30 min a byla průběžně kontrolována na zbývajícím objemu gelu, polymerujícího v kádince. Destilovaná voda byla slita, dále byl pipetován zaostřovací gel a vložen hřeben. Po ukončení polymerace, která trvala přibližně 15 min, byla aparatura vložena do elektroforetické vany. Oba elektrodové prostory byly naplněny elektrodoým pufrém a poté byl vyjmut hřeben.

Vzorky pro elektroforézu byly ředěny na výslednou koncentraci 1 mg/ml, dále smíchány v poměru 1:1 se vzorkovým pufrém (dle potřeby redukujícím nebo neredukujícím) a poté inkubovány při 100°C po dobu 5 min. Po vychladnutí byly vzorky

centrifugovány po dobu 10 s a pipetovány do jamek v gelu. Byl použit standard Page Ruler Broad Range, jehož rozsah uvádí Obr. 6.



Obr. 6: Rozsah standardu Page Ruler Broad Range. Jednotkou hmotnosti je kDa. Obrázek převzat a upraven.⁸⁸

Elektroforéza probíhala za vloženého napětí 80 V po dobu 45 min, které bylo dále zvýšeno na 130 V a dle potřeby na 150 V, dokud čelo, označené bromfenolovou modří, nedosáhlo vzdálenosti přibližně 0,5 cm od okraje separačního gelu. V závislosti na dalším průběhu pokusu byl gel buď dále zpracován elektropřenosovou technikou „Western blot“, nebo inkubován při laboratorní teplotě v barvicí lázni po dobu 45 min. Obarvený gel byl ponechán přes noc v odbarvovací lázni a po zviditelnění proteinů vysušen mezi celofánovými fóliemi. Pro účely pozdější prezentace byla pořízena fotokopie gelu.

3.5.4 Specifická detekce proteinů metodou „Western blot“

Metoda „Western blot“, též označovaná jako imunoblot, je specifická technika umožňující detekci konkrétního proteinu. Její nedílnou součástí je separace proteinů pomocí gelové elektroforézy v prostředí SDS následovaná horizontálním elektropřenosem proteinů na PVDF, nebo nitrocelulosovou membránu. Proteiny jsou na povrchu membrány detekovány pomocí specifických protilátek a vizualizovány pomocí chemické reakce, která poskytuje chromogenní produkt. V této práci byla použita protilátka proti Fab fragmentům, protilátka proti celému imunoglobulinu Y a detekce pomocí konkanavalinu A.

Konkanavalin A je lektin vázající se na N-glykoproteiny.⁸⁹ Vzhledem k přítomnosti glykosylovaných oligosacharidů na Fc fragmentu IgY a s ohledem k předchozímu ověření vzniku imunoprecipitátu metodou radiální imunodifuze byl konkanavalin A vybrán pro detekci Fc části IgY.⁸¹

Použité roztoky:

- *přenosový pufr*: 0,025 M TRIS, 0,192 M glycin, 10% (v/v) methanol, pH = 8,3
- *promývací roztok PBS-Triton*: 0,134 M NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, 0,3% (v/v) Triton X-100, pH = 7,2
- *blokovací roztok BSA*: PBS-Triton, 3% (w/v) BSA
- *blokovací roztok mléka*: 5% (w/v) odtučněné sušené mléko, v promývacím roztoku PBS-Triton
- *vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu*: tableta SigmaFast BCIP/NBT, rozpuštěna v 15 ml deionizované vody
- *vyvolávací roztok DAB pro peroxidasu*: tablety SigmaFast 3,3'diaminobenzidine tablets, rozpuštěny v 15 ml deionizované vody

Proteiny, separované pomocí chromatografie na iontoměničích DEAE, byly rozděleny gelovou elektroforézou v prostředí SDS (viz. 3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, str. 46). Byly určeny rozměry gelu. Elektroforetický gel byl dále inkubován v přenosovém pufru při laboratorní teplotě po dobu 20 min. Podle velikosti gelu bylo vystřiženo šest kusů filtračního papíru Whatmann a jeden kus PVDF membrány. Membrána byla inkubována v methanolu po dobu 30 s, poté v destilované vodě a nakonec v přenosovém pufru po dobu 5 min. Filtrační papír Whatmann byl ponořen do přenosového pufru. Pro přenos proteinů z gelu na membránu byly jednotlivé části v aparatuře pro horizontální elektropřenos poskládány v následujícím pořadí: tři filtrační papíry Whatmann, PVDF membrána, gel s proteiny, tři filtrační papíry Whatmann. Vzduchové bubliny byly vytlačeny pomocí skleněné tyčinky. Aparatura byla uzavřena a zatížena. Byl nastaven proud tak, aby byla proudová hustota 3,5 mA/cm² a přenos prováděn po dobu 45 min.

Po ukončení přenosu byl gel vložen do barvicí a poté do odbarvovací lázně (viz. 3.5.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS, str. 46). Z membrány

byla odstříhnuta dráha standardu, na několik vteřin vložena do barvicí lázně pro elektroforetické gely a poté odbarvena v odbarvovací lázni.

Membrána byla inkubována v blokovacím roztoku (dle potřeby byl použit blokovací roztok BSA nebo blokovací roztok mléka) za stálého míchání při 7°C přes noc. V závislosti na způsobu vizualizace určitého proteinu následoval jeden z příslušných postupů:

- *inkubace s konkanavalinem A a poté s peroxidasou*

Membrána byla inkubována v roztoku 0,05% (w/v) konkanavalinu A v blokovacím roztoku BSA. Inkubace probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Poté byla membrána dvakrát promyta 10 ml blokovacího roztoku BSA a inkubována za stálého míchání v 0,01% (w/v) roztoku peroxidasy při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Následně byla membrána dvakrát promyta 10 ml blokovacího roztoku BSA, třikrát 10 ml promývacího roztoku a opláchnuta destilovanou vodou. Pro vyvolání byla membrána ponořena do vyvolávacího roztoku DAB pro peroxidasu a po vizualizaci proužků byla reakce zastavena ponořením membrány do destilované vody.

- *inkubace s protilátkou proti Fab fragmentu*

Roztoky primární a sekundární protilátky byly ředěny blokovacím roztokem mléka. Membrána byla inkubována za stálého míchání v roztoku primární protilátky proti Fab fragmentu o koncentraci 1 µg/ml při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Poté byla membrána dvakrát promyta 10 ml blokovacího roztoku mléka a inkubována za stálého míchání v roztoku sekundární protilátky proti kozímu IgG s konjugovanou alkalickou fosfatase o koncentraci 0,08 µg/ml při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Následně byla membrána dvakrát promyta 10 ml blokovacího roztoku mléka, třikrát 10 ml promývacího roztoku a opláchnuta destilovanou vodou. Pro vyvolání byla membrána ponořena do vyvolávacího roztoku pro alkalickou fosfatase a po vizualizaci proužků byla reakce zastavena ponořením membrány do destilované vody.

- *inkubace s protilátkou proti IgY s konjugovanou peroxidasou*

Membrána byla inkubována za stálého míchání v 0,1% (v/v) roztoku primární protilátky proti IgY s konjugovanou peroxidasou při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Poté byla membrána dvakrát promyta 10 ml blokovacího roztoku mléka, třikrát 10 ml promývacího roztoku a opláchnuta destilovanou vodou. Pro vyvolání byla membrána ponořena do vyvolávacího roztoku DAB pro peroxidasu a po vizualizaci proužků byla reakce zastavena ponořením membrány do destilované vody.

3.5.5 Inhalační experiment

Experiment probíhal na základě projektu pokusu č. 31845/2008-1001 podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Pro inhalační experiment bylo použito deset potkaních samců kmene Wistar (Velaz, hmotnost potkanů před pokusem: cca 180 g, hmotnost potkanů po ukončení pokusu: cca 410 g). Zvířata byla ustájena v Centru pro experimentální biomodely 1. LF Univerzity Karlovy v Praze. Před zahájením pokusu a po jeho ukončení byl každému zvířeti odebrán vzorek krve. Bylo získáno krevní sérum (0,5 – 2 ml), které bylo analyzováno metodou ELISA na produkci specifických protilátek proti příslušným antigenům. Společně se získanou BAL (2,5 – 5 ml) bylo krevní sérum analyzováno také metodou Bio-Plex na produkci zánětlivých cytokinů a růstových faktorů. V BAL byla mikroskopicky analyzována přítomnost AM a lymfocytů.

3.5.5.1 Inhalační aplikace antigenů

Použité roztoky:

- *roztok Fab*: 2,6 mg/ml (po dialýze v PBS); 5,2 mg denně
- *roztok IgY*: 5,0 mg/ml (po dialýze v PBS); 10,0 mg denně
- *OVA*: 10 mg/ml, rozpuštěn v PBS; 20,0 mg denně
- *PBS*: 4 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaCl, pH = 7,2; 2 ml denně

Před inhalační aplikací Fab fragmentů byl vzorek zahuštěn na potřebnou koncentraci a dialyzován proti PBS po dobu několika dní s pravidelnou výměnou dialyzačního pufru.

Následně byla změřena A_{280} a jednotlivé vzorky byly sterilizovány přes mikrobiální filtr porozity $0,22\ \mu\text{m}$.

Zvířata byla rozdělena do pěti skupin po dvou jedincích. Schéma aplikace jednotlivých látek uvádí Tab. č. 2. Inhalace antigenů probíhala v inhalační komoře se zabudovaným nebulizátorem PARI BOY (průtok $0,2\ \text{ml/min}$) po dobu 28 dnů.

Tab. č. 2: Schéma inhalačního podání experimentálních látek

skupina	inhalovaná látka	koncentrace	denní dávka	poznámka
A	Fab	2,6 mg/ml	5,2 mg	28 dnů
B	IgY	5,0 mg/ml	10,0 mg	28 dnů
C	OVA	10,0 mg/ml	20,0 mg	28 dnů, pozitivní kontrola
D	PBS	4 mM	2 ml	28 dnů, negativní kontrola
E	-	-	-	negativní kontrola, záloha

3.5.5.2 Izolace experimentálního materiálu

Použité roztoky:

- *fyziologický roztok*: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , deionizovaná voda, pH = 7,4
- *ketamin (přípravek Narkamon)*: 50 mg/ml
- *xylazin*: 23,3 mg/ml
- *formaldehyd*: pH 7,2 – 7,4

Pro zjištění fyziologických změn plicní tkáně, produkce protilátek proti podávaným látkám a obsahu zánětlivých cytokinů byla zvířata v den ukončení experimentu uspána narkotiky a byl izolován experimentální materiál. Jednotlivým zvířatům byl intraperitoneálně podán xylazin ($16\ \text{mg/kg}$) a ketamin ($100\ \text{mg/kg}$) a odebrán vzorek krve. Uspání zvířat a odběr krevních vzorků probíhaly ve spolupráci s RNDr. Marií Zadinovou. Plíce byly instalovány na aparaturu pro BAL. Průdušky a plicní sklípky byly propláchnuty celkem třikrát fyziologickým roztokem ($4 - 6\ \text{ml}$). Poté byly plíce samospádem naplněny 5 ml formaldehydu, podvázány, odstřiženy od trachey a uchovány při 4°C ve formaldehydu.

Pro přípravu histologických preparátů byly plíce *in toto* fixovány 10% formaldehydem. Po fixaci byly přikrojeny reprezentativní úseky plicní tkáně, které byly zality do parafrínu. Následně byly připraveny histologické řezy, které byly obarveny hematoxylinem a eosínem. Mikroskopický obraz tkáně byl hodnocen dvěma patologi, prof. MUDr. Václavem Mandysem, CSc. a MUDr. Radimem Holušou.

Ze vzorku BAL byl odebrán 1 ml na stanovení počtu buněk a identifikaci jejich typu. Zbylý objem příslušných vzorků BAL byl centrifugován 10 min při 5 000x g a 4°C (Hermle). Supernatant byl alikvotován a uchován při -80°C. Ze sedimentu byl proveden nátěr na sklíčko pro mikroskopickou analýzu přítomnosti AM a lymfocytů. Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s prof. MUDr. Iljou Střížem, CSc z IKEM.

Vzorky krve odebrané před zahájením a po ukončení experimentu byly centrifugovány po dobu 10 min při 6 500 RPM (MLW). Krevní sérum bylo alikvotováno a uchováno při -80°C.

3.5.5.3 Analýza produkce protilátek proti podaným antigenům metodou ELISA

Metoda ELISA (z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“ – enzymová imunosorpční analýza) je velice účinná a citlivá metoda zjišťování přítomnosti protilátek proti konkrétnímu antigenu. Na základě specifické vazby mezi antigenem a protilátkou lze orientačně určit nejen produkci, ale také koncentraci protilátek. V této práci bylo pouhé potvrzení produkce protilátek dostačující.

Použité chemikálie:

- *PBS-ELISA*: 134 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, pH = 7,2
- *PBS-ELISA + Tween 20*: 134 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, 0,1% (v/v) Tween 20, pH = 7,2
- *imobilizační pufr*: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH = 9,6
- *blokovací roztok*: PBS-ELISA + Tween 20, 2% (w/v) BSA, pH = 7,2
- *roztok sekundární kozí protilátky proti potkanímu IgG s konjugovanou peroxidasou*: 1:10 000, ředěno blokovacím roztokem
- *TMB (substrát pro peroxidasu)*
- *deionizovaná voda*: pro přípravu všech roztoků

Do jamek 96-jamkových destiček „NUNC PolySorp“ bylo pipetováno po 100 μ l příslušných antigenů (Fab, IgY, OVA, PBS) ředěných v imobilizačním pufru (4 μ g/ml). Destičky s antigeny byly inkubovány přes noc při 4°C.

Destičky byly třikrát promyty 150 μ l pufru PBS-ELISA + Tween 20 a při každém promytí inkubovány po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Nespecifickým vazbám bylo zamezeno inkubací se 150 μ l blokovacího roztoku při 37°C po dobu 1 h. Jamky byly třikrát promyty pufrům PBS-ELISA + Tween 20 za výše uvedených podmínek. Následovala aplikace 100 μ l příslušných krevních sér (primárních protilátek), předem naředěných na dané koncentrace v pufru PBS-ELISA (1:1, 1:10, 1:100, 1:1 000). Inkubace probíhala při 37°C po dobu 2 h. Poté byly destičky pětkrát promyty pufrům PBS-ELISA + Tween 20 za výše uvedených podmínek. Do jamek bylo pipetováno po 100 μ l roztoku sekundární protilátky s navázanou peroxidasou a inkubováno při 37 °C po dobu 1 h. Destičky byly sedmkrát promyty a inkubovány při laboratorní teplotě se 150 μ l pufru PBS-ELISA + Tween 20 dle následujícího časového schématu: 3x5 min, 1x15 min, 3x5 min.

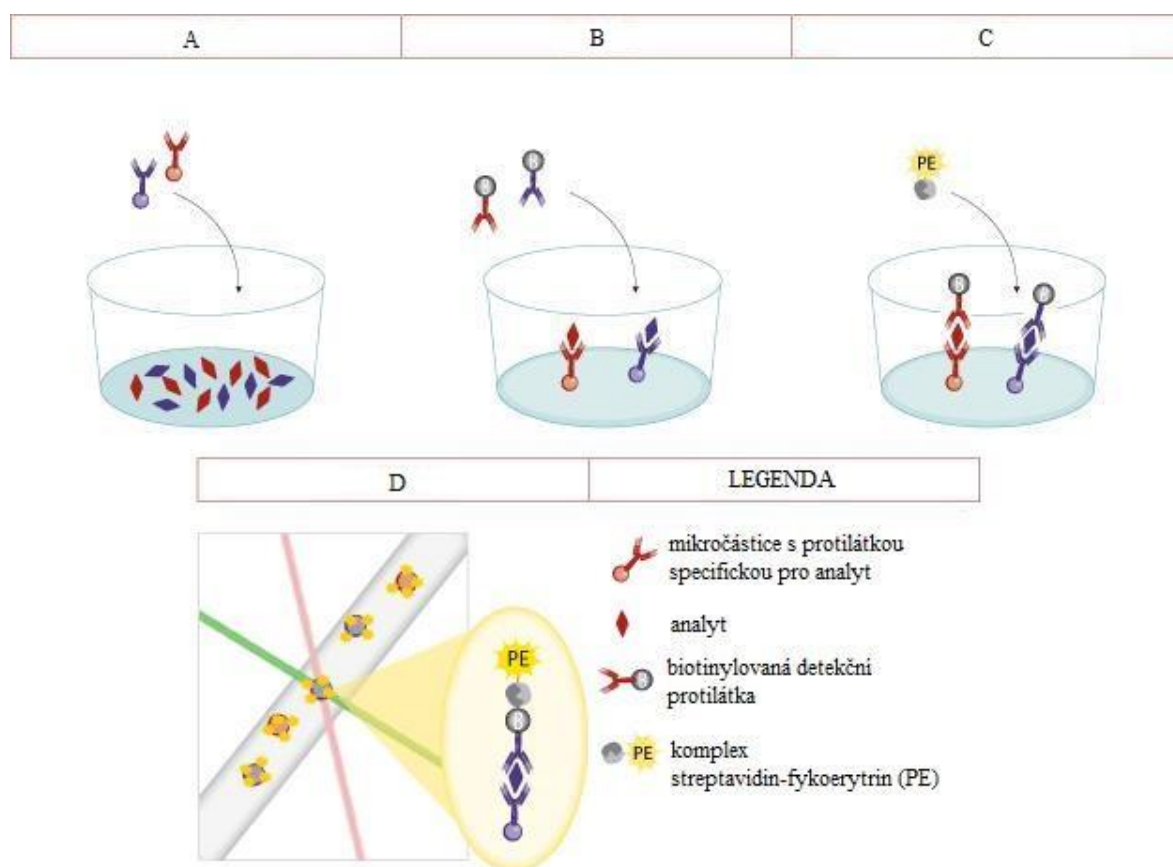
Do jamek bylo pipetováno po 100 μ l substrátu TMB pro peroxidasu. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě až do vzniku intenzivně zabarveného produktu. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 0,5 M H₂SO₄. Byla proměřena a vyhodnocena absorbance při 405 nm (Tecan).

3.5.5.4 Analýza produkce zánětlivých cytokinů metodou Bio-Plex

Přítomnost zánětlivých cytokinů a růstových faktorů v BAL a krevním séru byla stanovena metodou Bio-Plex, která využívá technologii xMAP Luminex®. Tato metoda je založena na detekci více analytů najednou v jednom vzorku (MAP z angl. „multianalyte profiling“). Stanovení se skládá z několika kroků: nejprve je vzorek (směs analytů) inkubován s mikroskopickými částicemi, nesoucími na svém povrchu protilátku proti analytu, jehož koncentrace je stanovována. Ke vzorku lze přidat více druhů protilátek najednou. Po promytí je směs inkubována s komplexem složeným z biotinu a detekční protilátky, která je specifická proti danému analytu. Po dalším promytí následuje inkubace s komplexem streptavidin-fykoerytrin (PE z angl. „phycoerythrin“) a dochází ke vzniku vazby mezi streptavidinem a biotinem.

Výsledný komplex je při průchodu úzkým kanálem ozařován dvěma lasery o různých vlnových délkách. První laser o vlnové délce 635 nm, tzv. klasifikační, vyvolá fluorescenci mikroskopických částic, díky kterým je rozpoznán konkrétní typ analytu vzhledem ke specifické protilátce navázané na povrchu částic. Druhý laser o vlnové délce 532 nm, tzv. reportérový, způsobí fluorescenci PE, čímž umožní určení koncentrace daného analytu.⁹⁰ Princip metody Bio-Plex (resp. xMAP Luminex®) znázorňuje Obr. 7.

V BAL a krevním séru byla analyzována přítomnost TNF- α , IL-1 β , IL-6 a GM-CSF. Detekce byla provedena na přístroji Bio-Plex 200 ve spolupráci s RNDr. Šárkou Růžickovou, PhD. z Laboratoře imunopatologie a imunoterapie Biotechnologického ústavu Akademie věd ČR, v.v.i.



Obr. 7: Princip metody Bio-Plex (resp. xMAP Luminex®). **A** – navázání mikroskopických částic na daný analyt prostřednictvím specifické protilátky, **B** – navázání specifické protilátky v komplexu s biotinem na daný analyt, **C** – navázání komplexu streptavidin-PE prostřednictvím vazby streptavidinu na biotin, **D** – ozáření dvěma lasery

a detekce fluorescence mikroskopických částic (identifikace typu analytu) a fykoerytrinu (určení koncentrace analytu). **PE** – fykoerytrin. Obrázek převzat a upraven.⁹⁰

3.5.6 Expoziční experiment na buněčných liniích

Pro účely této práce byly vybrány tři typy buněk plicního epitelu: A549, NuLi-1 a CuFi-1. Buněčná linie A549 byla odvozena od plicního adenokarcinomu 58-letého pacienta z alveolárních buněk typu II. Při kultivaci tvoří souvislou konfluentní vrstvu na povrchu kultivační nádoby a je vhodným modelovým organismem pro *in vitro* simulaci metabolismu plicních epiteliálních buněk.⁹¹ Imortalizované buňky z linie NuLi-1 jsou lidské epiteliální buňky, izolované z plic zdravého 36-letého pacienta.⁹² Imortalizované buňky z linie CuFi-1 jsou lidské epiteliální buňky, izolované z plic 14-leté pacientky trpící cystickou fibrosou.⁹³ Imortalizace buněčných linií je proces, při kterém buňky získávají neomezený proliferační potenciál. Tato schopnost je vlastní nádorovým buňkám a nádorovým buněčným liniím.⁹⁴ Epiteliální buňky linie NuLi-1 a CuFi-1 jsou schopné neomezené proliferace díky expresi genu pro hTERT (z angl. „human telomerase reverse transcriptase“ – lidská telomerasová reverzní transkriptasa) a onkogenů HPV-16 E6/E7 (z angl. „human papillomavirus“ – lidský papilomavirus). Na rozdíl od buněk linie NuLi-1 vykazují buňky linie CuFi-1 mutaci $\Delta F508$.^{92,93} Linie NuLi-1 a CuFi-1 tvoří souvislé vrstvy při kultivaci a jsou vhodnými modelovými organismy pro zkoumání mechanismů cystické fibrosy a vrozené imunity.

3.5.6.1 Kultivace buněk linie A549

Použité roztoky:

- **PBS-ELISA:** 134 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, pH = 7,2

Pro kultivaci buněk linie A549 bylo použito médium DMEM, obohacené o následující aminokyseliny: 0,28 mM L-alanin, 0,25 mM L-asparagin, 0,225 mM L-asparagová kyselina, 0,51 mM L-glutamová kyselina, 0,35 mM L-prolin a 2 mM L-glutamin. Médium bylo doplněno o 10% (v/v) FBS a gentamycin (50 µg/ml). Buňky byly inkubovány při 37°C v prostředí 5% CO₂.

Při dosažení konfluentní vrstvy byly buňky pasážovány následujícím způsobem: bylo odlito staré médium a buňky byly promyty roztokem PBS-ELISA. Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační nádoby byl použit digesční roztok 0,25% (w/v) trypsinu s obsahem 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA, který působil při 37°C po dobu 5 – 10 min. Digescce byla zastavena přidavkem 10 – 50% (v/v) FBS. Buněčná suspenze byla důkladně promíchána poté centrifugována při 3 000 RPM (VWR) po dobu 8 min. Supernatant byl dekantován a peleta resuspendována v čerstvém médiu. Buněčná suspenze byla převedena do kultivační lahve se sterilním médiem.

3.5.6.2 Kultivace buněk linie NuLi-1 a CuFi-1

Použité roztoky:

- ***PBS-ELISA:*** 134 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, pH = 7,2

Po rozmražení bylo potřeba buňky během prvních dvou pasáží kultivovat v kultivační lahvi potažené kolagenem. Roztok kolagenu (60 µg/ml) byl nejprve inkubován v kultivačních lahvích s povrchem o velikosti 25 cm² při laboratorní teplotě po dobu 18 h (nebo při 37°C po dobu 3 h). Poté byl přebytečný roztok kolagenu odlit, lahve dvakrát propláchnuty PBS-ELISA a po vyschnutí povrchu sterilizovány UV světlem přes noc.

Pro kultivaci buněk linie NuLi-1 a CuFi-1 bylo připraveno BEGM médium, tedy BEBM médium obohacené o následující suplementy, růstové faktory a antibiotika: 0,4% (V/V) BPE, 0,1% (V/V) hydrokortisonu, 0,1% (V/V) hEGF, 0,1% (V/V) epinefrinu, 0,1% (V/V) transferinu, 0,1% (V/V) insulinu, 0,1% (V/V) retinové kyseliny, 0,1% (V/V) trijodthyroninu a 50 µg/ml geneticinu. Buňky byly inkubovány při 37°C v prostředí 5% CO₂.

Při dosažení konfluentní vrstvy byly buňky pasážovány následujícím způsobem: bylo odlito staré médium. Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační nádoby byl použit digesční roztok 0,25% (w/v) trypsin s obsahem 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA, který působil při 37°C po dobu 5 – 10 min. Uvolnění buněk bylo zastaveno přidavkem stejného objemu 1% FBS. Buněčná suspenze byla důkladně promíchána poté centrifugována při 1 000 RPM (Hettich) po dobu 5 min. Supernatant byl dekantován a peleta resuspendována v čerstvém sterilním médiu. Buněčná suspenze byla převedena

do kultivační lahve se sterilním médiem. Při třetím a dalším pasážování byla buněčná suspenze převedena do kultivačních lahví bez kolagenového povrchu.

3.5.6.3 *Expoziční testy*

Pro zjištění potenciální imunogenicity dříve testovaných látek (viz 3.5.5. Inhalační experiment, str. 51) a také lidských a kozích imunoglobulinů byly provedeny expoziční testy, během kterých byla konfluentní vrstva buněk vystavena působení uvedených látek po dobu 24 h. Po ukončení expozice byly v médiu stanoveny cytokiny a růstové faktory. Pro správné porovnání jednotlivých vzorků bylo nutné normalizovat koncentraci cytokinů na počet buněk při expozici.

Pro expoziční testy byly použity 24-jamkové destičky Corning s povrchem „CellBIND“, který usnadňuje přisednutí buněk na kultivační povrch a umožňuje rychlejší růst i v médiích bez přídavku FBS.⁹⁵

Použité roztoky:

- *Fab*: výchozí koncentrace zásobního roztoku: 1,3 mg/ml
- *IgY*: výchozí koncentrace zásobního roztoku: 3,6 mg/ml
- *hIgG*, *gIgG*, *OVA*: výchozí koncentrace zásobního roztoku: 6,0 mg/ml
- *LPS*: výchozí koncentrace zásobního roztoku: 1,0 mg/ml
- *PBS-ELISA*: 134 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄, 1,0 mM NaH₂PO₄, pH = 7,2

Byly připraveny zásobní roztoky hIgG (z angl. „human immunoglobulin G“ – lidský imunoglobulin G), gIgG (z angl. „goat immunoglobulin G“ – kozí imunoglobulin typu G), OVA a LPS ředěním v PBS-ELISA. Výchozí a konečné koncentrace jednotlivých roztoků uvádí Tab. č. 3, str 59. Roztoky těchto látek byly centrifugovány při 13 000 RPM po dobu 10 min (Micro Centaur), supernatant byl sterilně převeden do dialyzačních aparatur (Novagen) a dialyzován proti 12 l PBS-ELISA při 7°C po dobu čtyř dnů. Dialyzační pufr byl vyměněn po dvou dnech.

Tab. č. 3: Výchozí a konečné koncentrace jednotlivých látek pro expozici

látko*	výchozí koncentrace zásobního roztoku v PBS-ELISA [mg/ml]	pracovní koncentrace v médiu [mg/ml]
Fab	1,3	1,0
IgY	3,6	1,0
hIgG	6,0	1,0
gIgG	6,0	1,0
OVA	6,0	1,0
LPS	1,0	0,08

* mezi působící látky patřily také negativní kontroly PBS-ELISA a příslušné médium (BEGM pro linie NuLi-1 a CuFi-1 a DMEM pro linii A549)

Vzorky hIgG, gIgG a OVA byly nejprve sterilně ředěny PBS-ELISA na koncentraci 3,6 mg/ml. Poté byly všechny takto připravené roztoky dále ředěny příslušným médiem na pracovní koncentraci (viz Tab. č. 3). Po dosažení konfluentní vrstvy byly buňky vystaveny působení Fab, IgY, hIgG, gIgG, OVA (1 mg/ml), LPS (80 µg/ml), PBS-ELISA a příslušnému médiu bez přídavku testovaných látek (viz Tab. č. 3). Expozice probíhala při 37°C v prostředí 5% CO₂ po dobu 24 hod. Poté bylo médium z každé jamky odebráno do mikrozkuřavky a centrifugováno při 4 300 RPM (Eppendorf) po dobu 10 min při 10°C. Supernatant byl přenesen do mikrozkuřavek a uchován při -80°C do dalšího zpracování.

Buňky v jamkách byly pasážovány výše uvedeným způsobem (viz. 3.5.6.1 Kultivace buněk linie A549, str. 56 a 3.5.6.2 Kultivace buněk linie NuLi-1 a CuFi-1, str. 57). Po centrifugaci byla peleta resuspendována ve 100 µl PBS-ELISA. Buněčná suspenze byla 20x ředěna barvicím činidlem „Muse Count & Viability“ a dle doporučení výrobce byl analyzován počet buněk na přístroji Muse Cell Analyzer.

V buněčném médiu byla provedena detekce přítomnosti TNF-α, IL-1β, IL-6 a GM-CSF metodou Bio-Plex (viz. 3.5.5.4 Analýza produkce zánětlivých cytokinů metodou Bio-Plex, str. 54). Detekce byla provedena na přístroji Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader

ve spolupráci s RNDr. Jindrou Vrzalovou, PhD. z Laboratoře imunochemické diagnostiky
Fakultní nemocnice Plzeň.

4 Výsledky

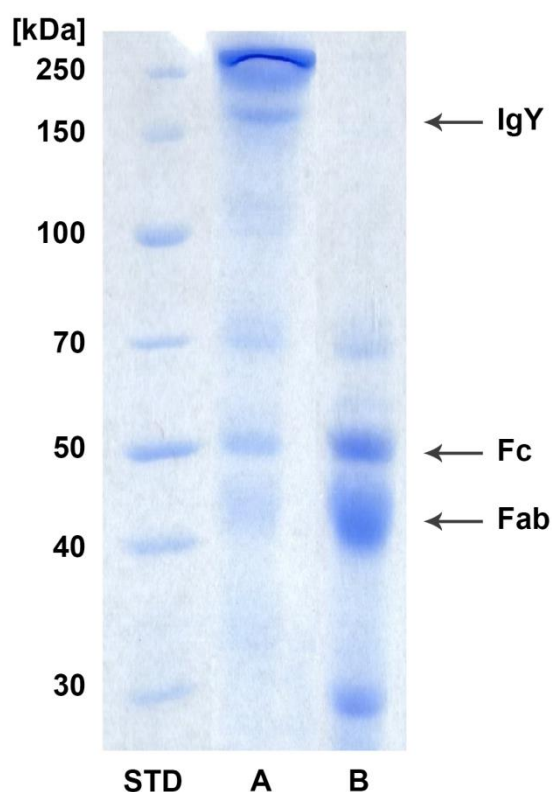
4.1 Příprava proteinových vzorků

Pro inhalační experiment a expoziční testy bylo potřeba připravit vzorky jednotlivých protilátek. Klíčovým krokem v této práci byla příprava dostatečného množství preparátu Fab fragmentů, včetně průkazu jeho čistoty.

4.1.1 Štěpení IgY a separace Fab fragmentu

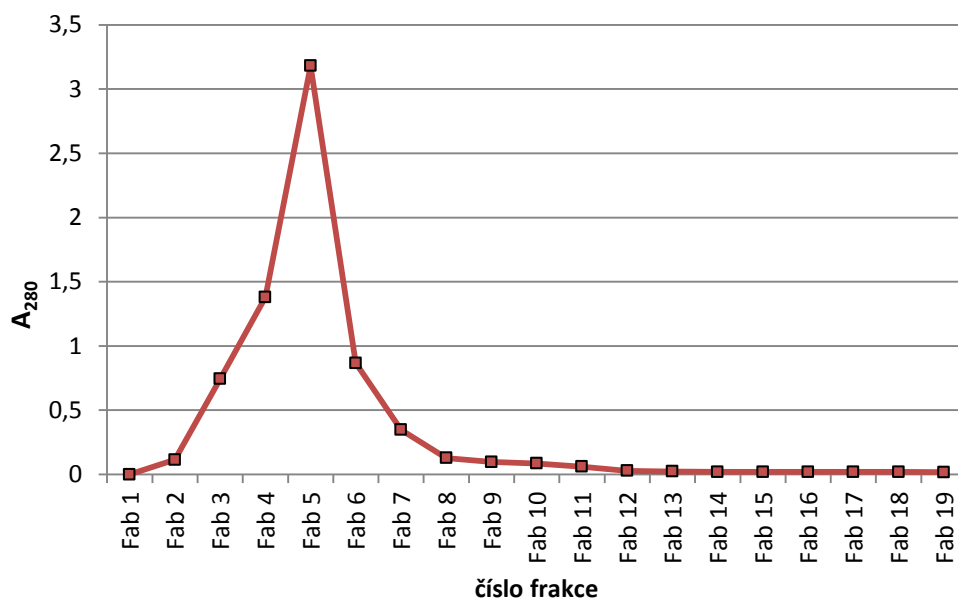
Pro účely této práce bylo zvoleno štěpení enzymem papainem, které poskytuje tři výsledné produkty: dva fragmenty Fab (44 kDa) a jeden fragment Fc (55 kDa). Na rozdíl od Fc fragmentu umožňují Fab fragmenty specifickou vazbu.⁸⁴

V průběhu experimentu bylo celkem štěpeno 300 mg IgY. V této práci byly použity podmínky štěpení, které byly optimalizovány v pilotních experimentech a následně použity v preparativním rozsahu. Vzorky před digescí a po digesci byly analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS s použitím 10% separačního gelu a neredukujícího prostředí (viz Obr. 8, str. 62). V dráze se zásobním roztokem IgY (viz Obr. 8 A, str. 62) je patrná zóna o přibližné velikosti 180 kDa odpovídající neštěpené molekule IgY. Působením papainu tato zóna mizí a v dráze se štěpnými produkty (viz Obr. 8 B, str. 62) se objevují dvě nové zóny: širší o velikosti 44 kDa (Fab) a užší o velikosti 55 kDa (Fc).

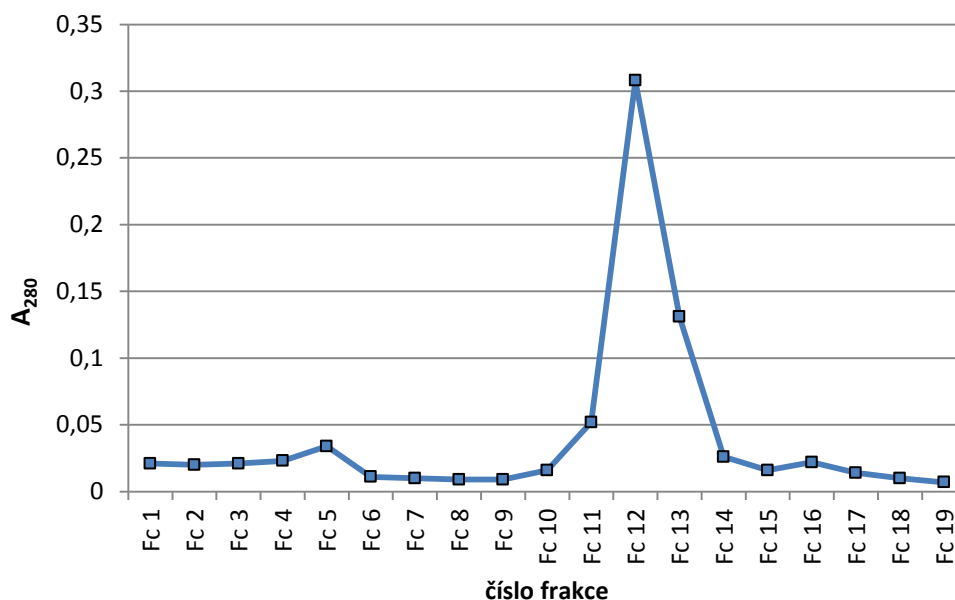


Obr. 8: Štěpení IgY a separace Fab fragmentu. **STD** – standard molekulových hmotností (Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific), **A** – vzorek intaktní IgY, **B** – vzorek IgY po štěpení. V dráze A se objevuje zóna o přibližné velikosti 180 kDa odpovídající IgY před štěpením, v dráze B dvě zóny patřící Fab fragmentu (44 kDa) a Fc fragmentu (55 kDa). Elektroforéza probíhala na 10% separačním gelu a v neredukujícím prostředí.

Digesční produkty byly separovány pomocí chromatografie na iontoměniči DEAE. Z hodnot A_{280} jednotlivých frakcí byl sestaven eluční profil. Eluci Fab fragmentu znázorňuje Obr. 9, str. 63. Absorbance začala narůstat ve frakci Fab 2 a vrcholila ve frakci Fab 5. Počínaje frakcí Fab 6 došlo k poklesu A_{280} . Eluční profil Fc fragmentu znázorňuje Obr. 10, str. 63. Absorbance narůstala ve frakci Fc 11, v následující frakci vrcholila a od frakce Fc 13 dále klesala.

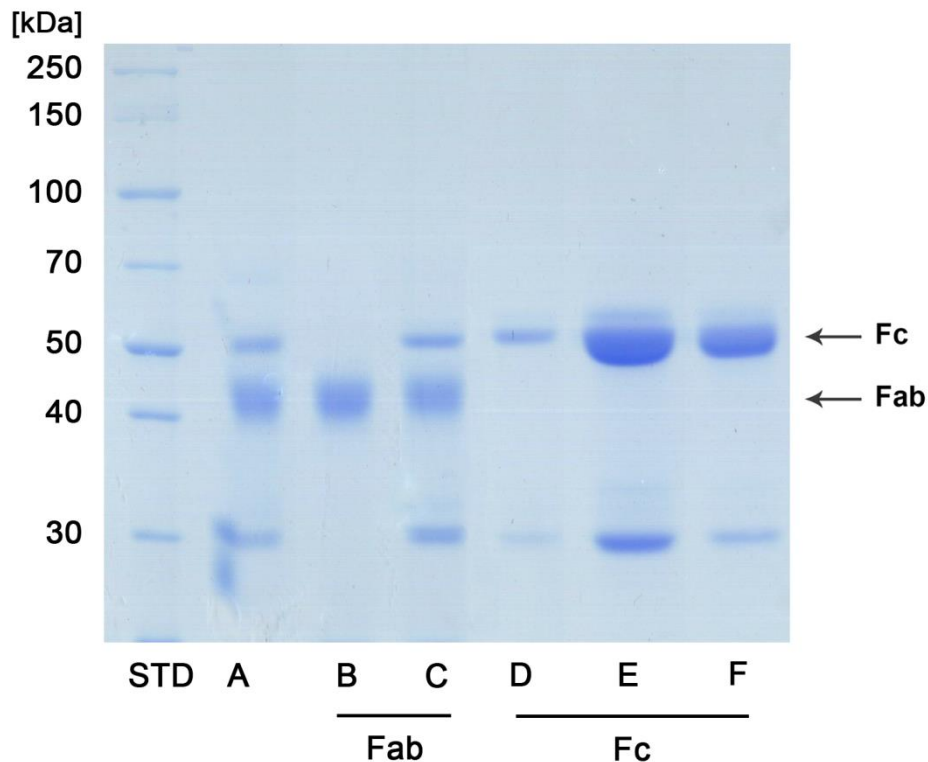


Obr. 9: Eluční profil Fab fragmentu. Kolona byla promývána roztokem pro eluci Fab fragmentu (100 mM TRIS-HCl, pH = 8,0). Byly jímány 5 ml frakce. Rychlost průtoku byla 0,56 ml/min. Pro měření byly frakce řaděny tak, aby A_{280} nepřesáhla hodnotu 1.



Obr. 10: Eluční profil Fc fragmentu. Kolona byla promývána roztokem pro eluci Fc fragmentu (100 mM TRIS-HCl, 200 mM NaCl, pH = 8,0). Byly jímány 5 ml frakce. Rychlost průtoku byla 0,56 ml/min.

Po eluci obou fragmentů byly frakce Fab 2, Fab 6, Fc 11, Fc 12 a Fc 13 analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (viz Obr. 11) s použitím 10% separačního gelu a neredukujícího prostředí.



Obr. 11: Elektroforéza vybraných frakcí získaných separací Fab fragmentu. **STD** – standard molekulových hmotností (Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific), **Fab** – frakce získané elucí Fab fragmentu, **Fc** – frakce získané elucí Fc fragmentu, **A** – vzorek IgY po štěpení, **B** – frakce Fab 2, **C** – frakce Fab 6, **D** – frakce Fc 11, **E** – frakce Fc 12, **F** – frakce Fc 13. V dráze B je viditelná zóna odpovídající Fab fragmentu (44 kDa). V drahách D, E a F je patrná zóna odpovídající Fc fragmentu (55 kDa). Elektroforéza probíhala na 10% separačním gelu a v neredukujícím prostředí.

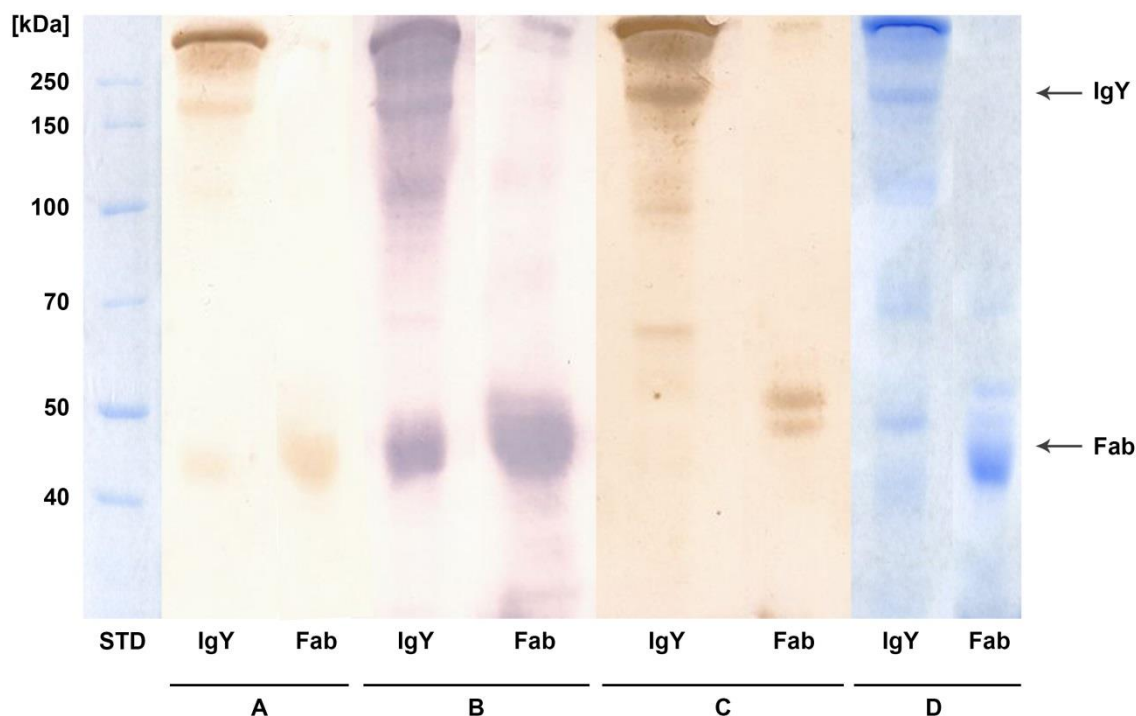
Kontrola vybraných frakcí Fab a Fc fragmentů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS potvrdila přítomnost Fab fragmentu ve frakcích Fab 2 a Fab 6 (viz Obr. 11 B, C). Kromě zóny Fab fragmentu (44 kDa) byla ve frakci Fab 6 (viz Obr. 11 C) přítomna také zóna o molekulové hmotnosti 55 kDa (Fc).

Ve frakcích Fc 11 – Fc 13 (viz Obr. 11 D – F, str. 64) byla přítomna zóna o molekulové hmotnosti 55 kDa značící přítomnost Fc fragmentu. Intenzita této zóny byla největší ve frakci Fc 12 (viz Obr. 11 G, str. 64)

Frakce Fab s nejvyšší hodnotou A_{280} byly spojeny (Fab 2 – Fab 5). Tento vzorek byl analyzován technikou „Western blot“ s různými způsoby vyvolání (viz Obr. 12 Fab).

4.1.2 Specifická detekce IgY a Fab

Vzorek IgY byl účinně štěpen enzymem papainem na Fab a Fc fragmenty. Fc část byla od Fab fragmentu separována pomocí chromatografie na iontoměniči DEAE. Pro specifickou detekci IgY a připravených Fab fragmentů byla použita technika „Western blot“ s různými způsoby vyvolání. Pro vizualizaci byla použita protilátka proti Fab fragmentům, protilátka proti celé molekule IgY a detekce sacharidových komponent Fc fragmentu pomocí konkanavalinu A. Výsledky prezentuje Obr. 12.



Obr. 12: Detekce Fab a IgY. **STD** – standard molekulových hmotností (Page Ruler Broad Rande Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific), **IgY** – vzorek IgY, **Fab** – vzorek Fab (IgY štěpený papainem a po chromatografii na iontoměniči DEAE, spojení frakcí

Fab 2 – Fab 5), Detekce pomocí: **A** – protilátky proti celé molekule IgY, **B** – protilátky proti Fab fragmentu, **C** – konkanavalinu A, **D** – elektroforéza v prostředí SDS. Elektroforéza probíhala na 10% separačním gelu a v neredukujícím prostředí.

Protilátka proti IgY zvýraznila několik zón (viz Obr. 12 A, str. 65). V dráze s IgY se jedná o nápadnou zónu okolo 180 kDa (IgY) a dále slabou zónu mezi 40 – 50 kDa. V dráze se vzorkem Fab fragmentů se vyskytuje výrazná zóna v podobném rozmezí, poukazující na přítomnost Fab fragmentů (44 kDa). Zóna o stejné velikosti, avšak podstatně výraznější, se vyskytuje v dráze s Fab fragmenty na membráně, vyvolané protilátkou proti Fab fragmentu (viz Obr. 12 B, str. 65). Na této membráně je rovněž pozorovatelná obdobná zóna v dráze se vzorkem IgY, stejně tak zóna o velikosti 180 kDa (IgY). Membrána inkubovaná v roztoku konkanavalinu A (viz Obr. 12 C, str. 65), konkrétně dráha s roztokem Fab fragmentů, vykazuje přítomnost dvou výrazných zón v oblasti okolo 50 kDa. V dráze se vzorkem IgY lze pozorovat jednu výraznou zónu v oblasti 180 kDa (IgY) a dále několik zón v oblasti pod 70 kDa a okolo 100 kDa. Zóny odpovídající Fab fragmentům a molekule IgY se vyskytují také na gelu z elektroforézy v prostředí SDS v drahách s obsahem Fab fragmentů a molekuly IgY (viz Obr. 12 D, str. 65).. Na všech membránách lze u vzorků IgY pozorovat výraznou zónu v oblasti vyšší, než je standard. Jedná se o agregáty imunoglobulinů, které se ve vzorcích běžně formují.⁹⁶

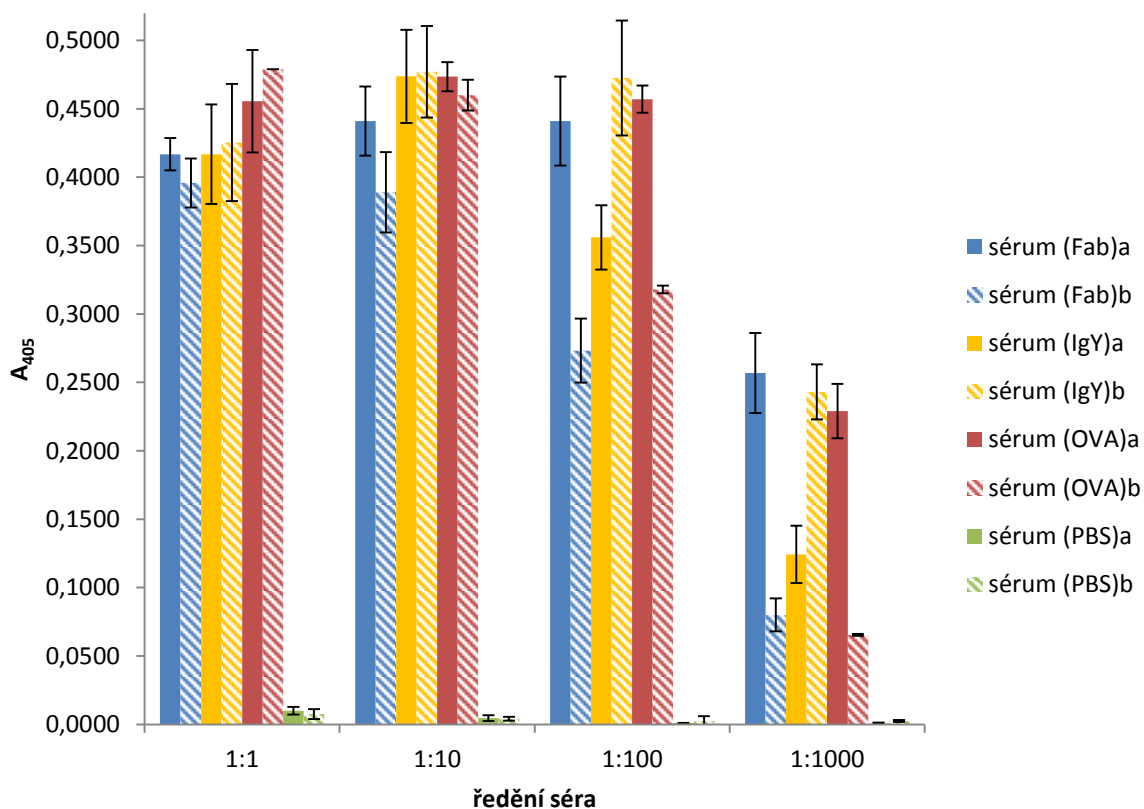
4.2 Inhalační expozice potkanů proteinovým vzorkům

Dvojice potkanů kmene Wistar byly vystaveny každodennímu inhalačnímu působení Fab fragmentů (5,2 mg/zvíře), IgY (10,0 mg/zvíře), OVA (20,0 mg/zvíře) nebo PBS (2 ml/zvíře). Poslední skupina dvou jedinců nebyla vystavena žádné inhalaci. Všechna experimentální zvířata během 28-denním pokusu dobře prosperovala bez viditelného negativního působení inhalační expozice. Konečná hmotnost potkanů se pohybovala okolo 410 g. Před započítím a po ukončení experimentu byla od každého potkana odebrána krev, ze které bylo získáno krevní sérum. Dále byl výplachem plic získán vzorek BAL.

4.2.1 Imunogenicitá inhalačně podaných antigenů

Po ukončení inhalačního experimentu bylo prověřováno, zda byly testované proteiny imunogenní. Ke zjištění produkce specifických protilátek proti inhalovaným antigenům byla použita metoda ELISA. Výsledky detekce specifických protilátek v séru uvádí Obr. 13.

Byla pozorována závislost A_{405} na ředění krevního séra potkanů, inhalujících jednotlivé látky. Nízká ředění krevního séra (1:1, 1:10) poskytla hodnoty A_{405} , které se jen nevýznamně liší. Tento obraz odpovídá situaci, kdy je přesycen sorbovaný antigen. Až při vyšších ředěních 1:100 a 1:1000 bylo možno detekovat významně rozdílné hodnoty A_{405} , jak podle typu antigenu, tak mezi jedinci v rámci skupiny. Krevní séra potkanů inhalujících PBS vykazovala dle očekávání nízké hodnoty A_{405} .



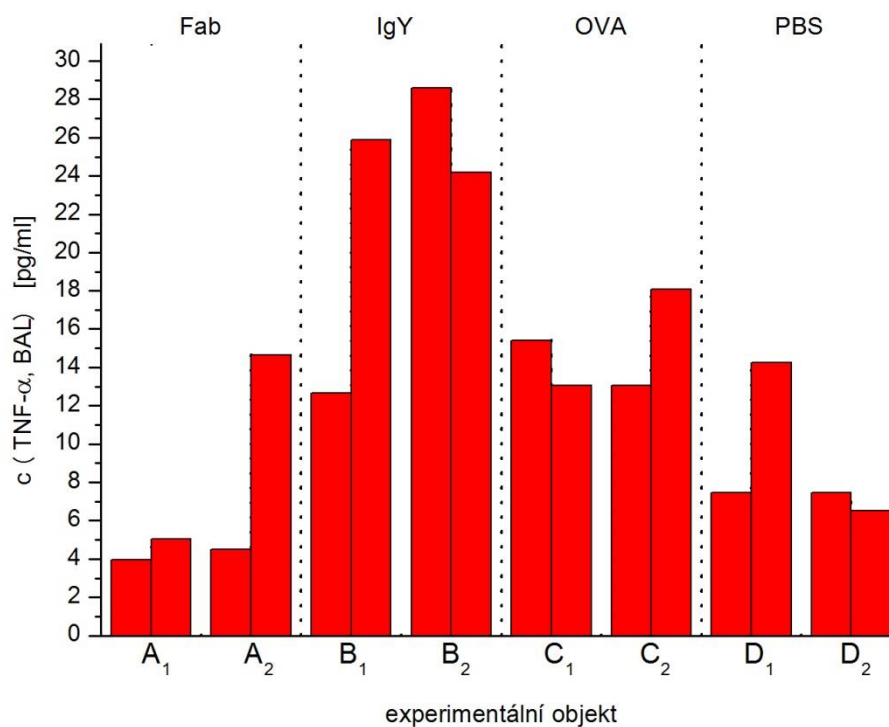
Obr. 13: Detekce přítomnosti specifických protilátek proti inhalovaným antigenům. Graf znázorňuje závislost reaktivních protilátek (vyjádřeny pomocí A_{405}) na ředění krevního séra potkanů inhalujících jednotlivé vzorky. Průměrná výchozí hodnota A_{405} (protilátky v krevním séru před expozicí) byla 0,0617. Každá skupina obsahovala dva potkany

označené **a** a **b**. **sérum (Fab)** – krevní sérum objektu, exponovaného Fab fragmentům; **sérum (IgY)** – krevní sérum objektu, exponovaného IgY; **sérum (OVA)** – krevní sérum objektu, exponovaného OVA; **sérum (PBS)** – krevní sérum objektu, exponovaného PBS

4.2.2 Vliv inhalovaných antigenů na vyvolání zánětu plic

Byl pozorován vliv inhalace slepičích IgY a připravených Fab fragmentů na možné změny v plicích potkanů. Experiment byl vyhodnocen ze dvou pohledů: měřením koncentrace vybraných zánětlivých cytokinů v BAL a krevním séru metodou Bio-Plex a histologickou analýzou ovlivněné plicní tkáně.

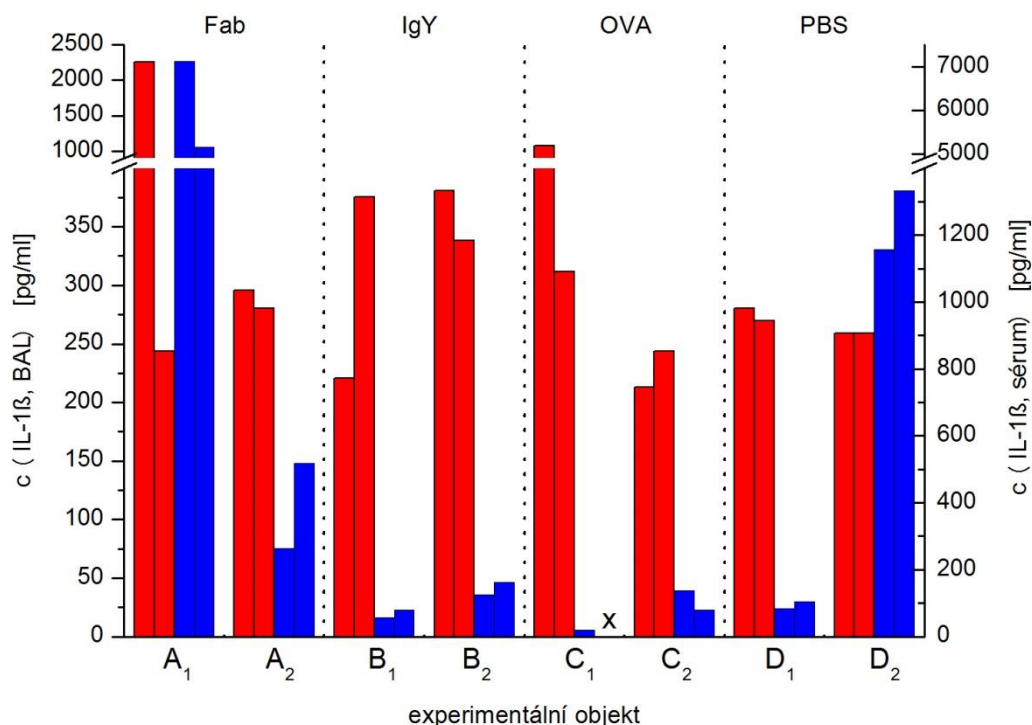
Výsledky stanovení zánětlivého cytokinu TNF- α uvádí Obr. 14, str. 69. Nejvyšší produkci TNF- α v BAL vykazovala skupina inhalující IgY (Obr. 14 B, str. 69.). Koncentrace TNF- α v BAL této skupiny dosáhla hodnoty 28,6 pg/ml. Nízkou produkci TNF- α v BAL prokázala skupina inhalující Fab fragmenty, u které se většina hodnot pohybovala okolo 5 pg/ml (Obr. 14 A, str. 69.), podobně jako u kontrolní skupiny potkanů inhalujících PBS (Obr. 14 D, str. 69.). Skupina inhalující OVA (Obr. 14 C, str. 69.) produkovala TNF- α o průměrné koncentraci v porovnání s ostatními skupinami (přibližně 15 pg/ml).



Obr. 14: Koncentrace TNF- α v BAL. Pro každého potkana byla provedena dvě nezávislá stanovení koncentrace TNF- α . Získané hodnoty nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Přítomnost TNF- α v krevním séru není zobrazena, jelikož koncentrace nedosáhla minimální hranice potřebné pro detekci (2,2 pg/ml). Potkani inhalovali: **A** – Fab fragmenty, **B** – IgY, **C** – OVA, **D** – PBS. Každá skupina obsahovala dva potkany označené **1** a **2**.

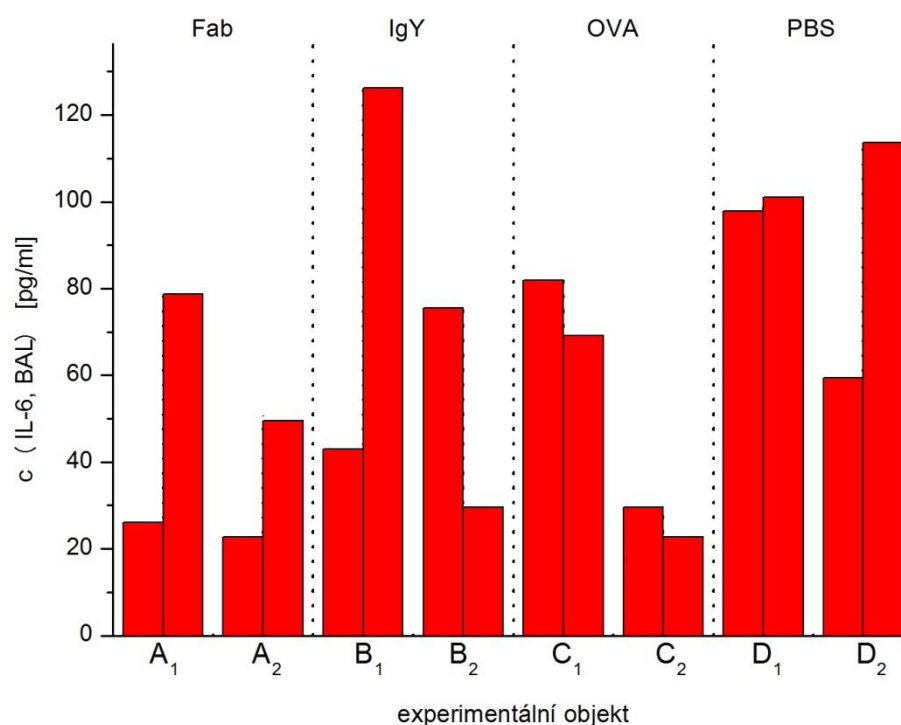
Výsledky stanovení zánětlivého cytokinu IL-1 β uvádí Obr. 15, str. 70. Vysoká produkce IL-1 β v BAL byla nalezena u potkanů A₁ (2 261 pg/ml) a C₁ (1 077 pg/ml). Koncentrace IL-1 β v BAL ostatních jedinců byla nižší a vzájemně relativně srovnatelná (v rozmezí 213 pg/ml C₂ – 381 pg/ml B₂). Vzájemně podobné hodnoty IL-1 β v BAL byly pozorovatelné u skupiny inhalující PBS (Obr. 15, str. 70.), tj. okolo 267 pg/ml. Až na výjimku byl tento trend pozorovatelný u skupiny potkanů, inhalujících IgY (Obr. 15 B, str. 70.), tj. okolo 365 pg/ml. Významně zvýšenou hodnotu koncentrace IL-1 β v krevním séru vykazoval potkan A₁ (7 126 pg/ml). Zvýšenou hodnotu IL-1 β v krevním séru lze rovněž pozorovat u zvířete D₂ (1 333 pg/ml). Koncentrace IL-1 β v krevním séru

potkanů $A_2 - D_1$ byla, v porovnání s výše uvedenými, relativně nízká (21 pg/ml $C_1 - 518 \text{ pg/ml}$ A_2).



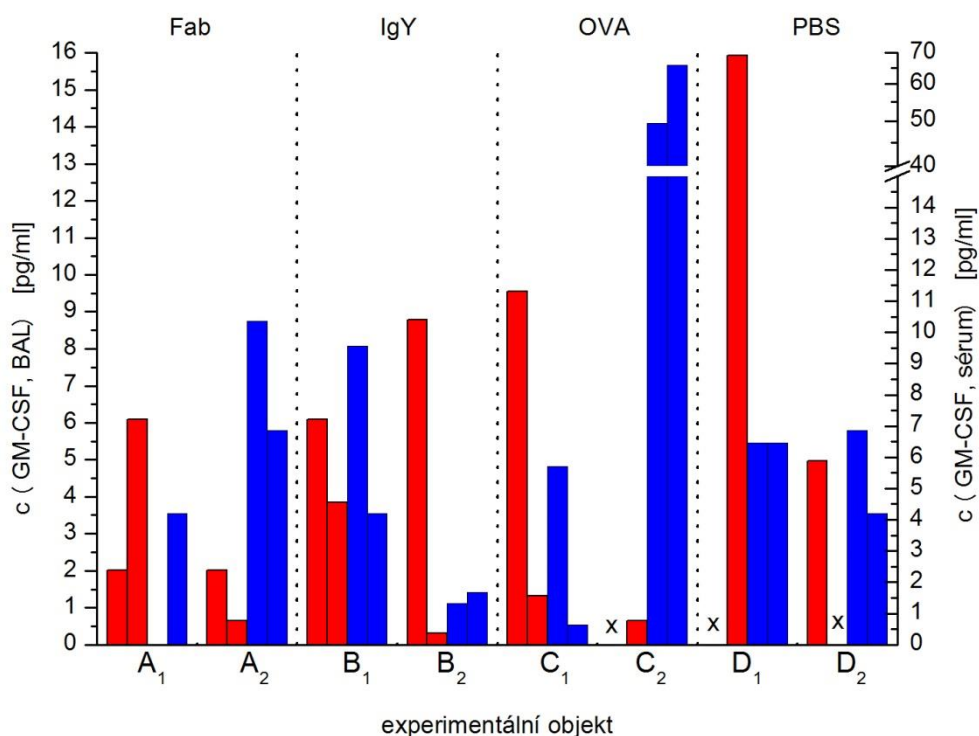
Obr. 15: Koncentrace IL-1 β v BAL a krevním séru. Pro každého potkana byla provedena dvě nezávislá stanovení koncentrace IL-1 β . Získané hodnoty nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Potkani inhalovali: **A** – Fab fragmenty, **B** – IgY, **C** – OVA, **D** – PBS. Každá skupina obsahovala dva potkany označené **1** a **2**. **x** – hodnota pod hranicí detekce ($3,3 \text{ pg/ml}$), ● – koncentrace IL-1 β v BAL, ● – koncentrace IL-1 β v krevním séru

Výsledky stanovení zánětlivého cytokinu IL-6 uvádí Obr. 16, str. 71. Významně zvýšenou hodnotu koncentrace IL-6 v BAL bylo možno pozorovat u jednoho stanovení u potkanů B_1 (126 pg/ml) a D_2 (114 pg/ml). V rámci skupiny inhalující PBS (Obr. 16 D, str. 71) byly hodnoty koncentrace IL-6 v BAL, až na výjimku, podobné (okolo 104 pg/ml). U ostatních skupin nebyl tento trend zřetelný a hodnoty koncentrace IL-6 v BAL se v rámci skupiny významně odlišovali.



Obr. 16: Koncentrace IL-6 v BAL. Pro každého potkana byla provedena dvě nezávislá stanovení koncentrace IL-6. Získané hodnoty nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Přítomnost IL-6 v krevním séru není vyobrazena, jelikož koncentrace nedosáhla minimální hranice potřebné pro detekci (8,1 pg/ml). Potkani inhalovali: **A** – Fab fragmenty, **B** – IgY, **C** – OVA, **D** – PBS. Každá skupina obsahovala dva potkany označené **1** a **2**.

Výsledky stanovení růstového faktoru GM-CSF ukazuje Obr. 17, str. 72. Významně vysokou hodnotu koncentrace GM-CSF v BAL prokázal potkan D₁ (16 pg/ml). Vyšší hodnoty koncentrace GM-CSF byly pozorovatelné u zvířat C₁ (10 pg/ml) a B₂ (9 pg/ml). Nejvyšší hodnota koncentrace GM-CSF v krevním séru byla nalezena u zvířete C₂ (66 pg/ml). Podobnost v krevních sérech obou potkanů v rámci jedné skupiny byla zjištěna u jedinců inhalujících PBS (Obr. 17 D, str. 72.), u kterých se hodnota koncentrace růstového faktoru GM-CSF pohybuje, až na výjimku, okolo 6,6 pg/ml.



Obr. 17: Koncentrace GM-CSF v BAL a krevním séru. Pro každého potkana byla provedena dvě nezávislá stanovení GM-CSF. Získané hodnoty nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Potkani inhalovali: **A** – Fab fragmenty, **B** – IgY, **C** – OVA, **D** – PBS. Každá skupina obsahovala dva potkany označené **1** a **2**. **x** – hodnota pod hranicí detekce (0,3 pg/ml), ● – koncentrace GM-CSF v BAL, ● – koncentrace GM-CSF v krevním séru

4.2.3 Mikroskopická analýza BAL a histologické vyšetření exponované plicní tkáně

Pro detekci změn v plicní tkáni po expozici potkanů vybraným látkám byly provedeny cytologická analýza BAL a histologické vyšetření plicní tkáně.

Výsledky diferenciálního odečtu AM a lymfocytů v BAL potkanů uvádí Tab. č. 4, str. 73. Přes určitou individuální biologickou variabilitu jsou hodnoty AM srovnatelné. Lymfocyty se u skupiny inhalující OVA a u potkana č. 2 inhalujícího PBS vyskytovaly ve zvýšeném množství. Na základě zjištěných hodnot bylo i přes individuální rozdíly vyloučeno navození akutního zánětu. Mikroskopický preparát BAL potkana č. 2

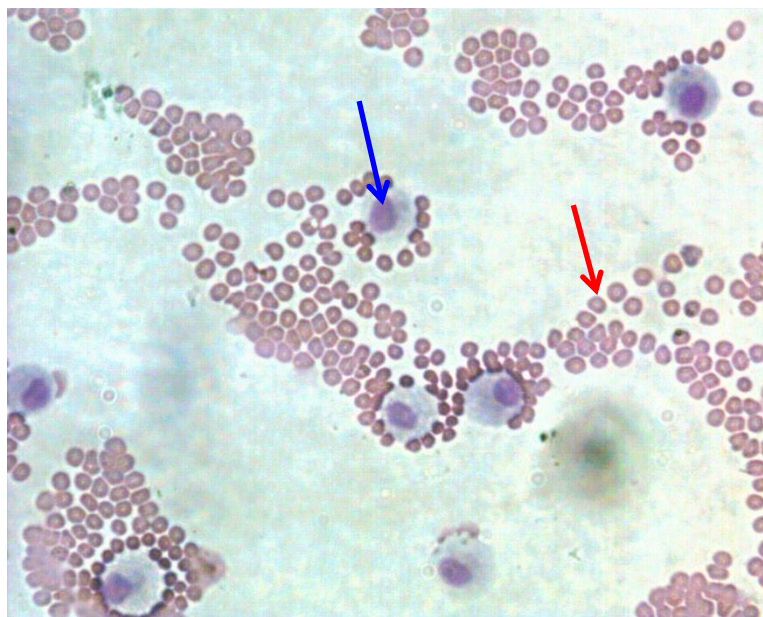
inhalujícího OVA znázorňuje Obr. 18, str. 74. Je zde patrná přítomnost AM a červených krvinek.

Tab. č. 4: Diferenciální odečet AM a lymfocytů v BAL

skupina	inhalovaná látka	jedinec	počet AM v BAL	počet lymfocytů v BAL
A	Fab	1	94	6
		2	94	5
B	IgY	1	97	3
		2	98	2
C	OVA	1	58	39
		2	70	26
D	PBS	1	98	2
		2	55	45
E	-	1	92	8
		2	74	26

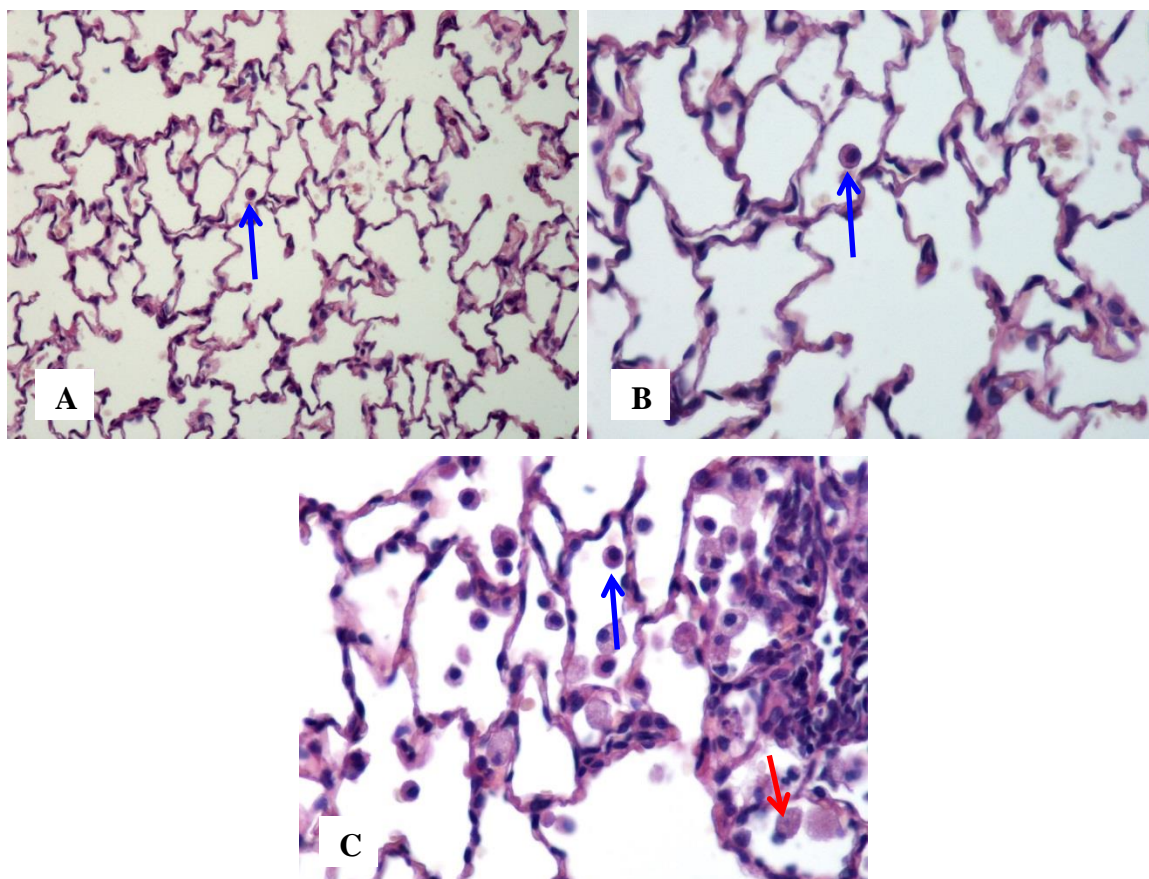
Diferenciální odečet AM a lymfocytů v BAL byl proveden ve spolupráci s prof. MUDr. Iljou Střížem, CSc. v IKEM.

AM – alveolární makrofágy, BAL – bronchoalveolární laváž, Fab – Fab fragmenty, IgY – imunoglobulin Y, OVA – ovalbumin, PBS – fosfátový pufr



Obr. 18: Mikroskopický preparát BAL potkana č. 2 inhalujícího OVA. Zvětšeno 400x.
 ● – alveolární makrofágy, ● – červené krvinky

Histologické vyšetření plicní tkáně u všech vyšetřených potkanů neprokázalo přítomnost zánětlivých změn plicního parenchymu. Struktura plicního parenchymu byla normální s obvyklou vzdušností. Mikroskopický obraz neexponovaného potkana č. 1 (E_1) a potkana č. 1 inhalujícího OVA (C_1) jsou znázorněny na Obr. 19, str. 75. Plicní tkáň neexponovaného potkana E_1 měla normální strukturu a obvyklou vzdušnost. V plicních sklípcích byly přítomny izolované AM, které se v malém množství v alveolech běžně vyskytují (viz Obr. 19 A B, str. 75) Identický nález byl i u zvířat inhalujících Fab, IgY a PBS; u těchto potkanů bylo zjištěno nevýrazné fokální zmnožení AM. U potkanů inhalujících OVA byly navíc v alveolech pozorovány i ojedinělé drobné skupinky AM s pěnitou cytoplazmou (viz Obr. 19 C, str. 75.).



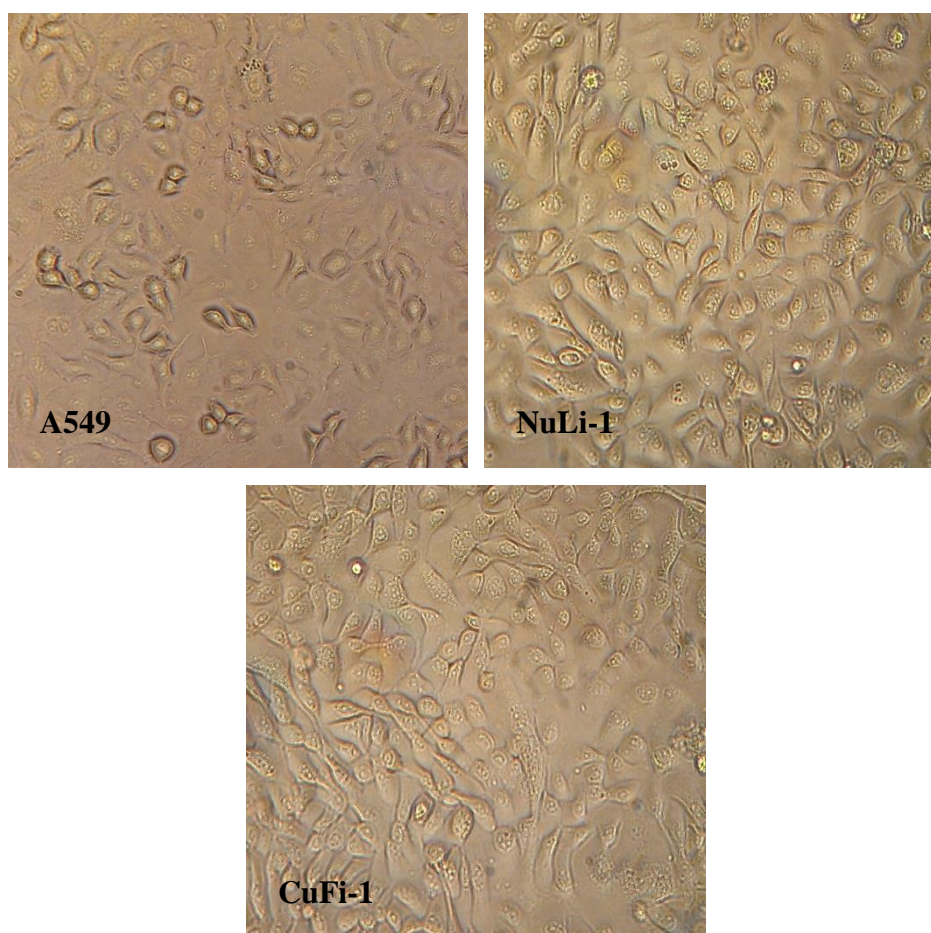
Obr. 19: Histologické řezy potkaních plic. Reprezentativní obrázky znázorňují řezy plic: **A** – neexponovaného potkana č. 1 (E_1), zvětšeno 200x; **B** – neexponovaného potkana č. 1 (E_1), zvětšeno 400x; **C** – potkana č. 1 inhalujícího OVA (C_1), zvětšeno 400x. ● – alveolární makrofágy s běžnou strukturou cytoplazmy, ● – alveolární makrofágy s pěnitou cytoplazmou. Histologické vyšetření bylo provedeno ve spolupráci s prof. MUDr. Václavem Mandysem, CSc. v Ústavu patologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady.

4.3 *Ex vivo* působení antigenů na plicní buňky

V této práci byl kromě *in vivo* experimentálního modelu použit také model *ex vivo*, který zahrnoval buňky A549 plicního adenokarcinomu, plicní buňky NuLi-1 ze zdravého pacienta a plicní buňky CuFi-1, izolované z pacienta, trpícího cystickou fibrosou. Po 24-hodinové expozici vybraným látkám byla v médiu stanovena přítomnost vybraných zánětlivých cytokinů metodou Bio-Plex.

4.3.1 Kultivace buněk A549, NuLi-1 a CuFi-1

Během rutinní kultivace buněk nebyla v žádné buněčné linii pozorována bakteriální kontaminace. Buňky linie NuLi-1 a CuFi-1 byly po druhé pasáži kultivovány v lahvích bez kolagenového povrchu. Tato změna podmínek nepřinesla žádné komplikace a buňky prosperovaly dle očekávání. Výsledky mikroskopického pozorování buněk při běžné kultivaci, která předcházela expozičním testům, uvádí Obr. 20. Buňky v této fázi téměř dosahují konfluentní vrstvy.



Obr. 20: Mikroskopické obrazy buněčných linií. Byly použity tři buněčné linie: **A549**, **NuLi-1** a **CuFi-1**. Buňky dobře prosperují a jsou bez známek kontaminace. Zvětšeno 400x.

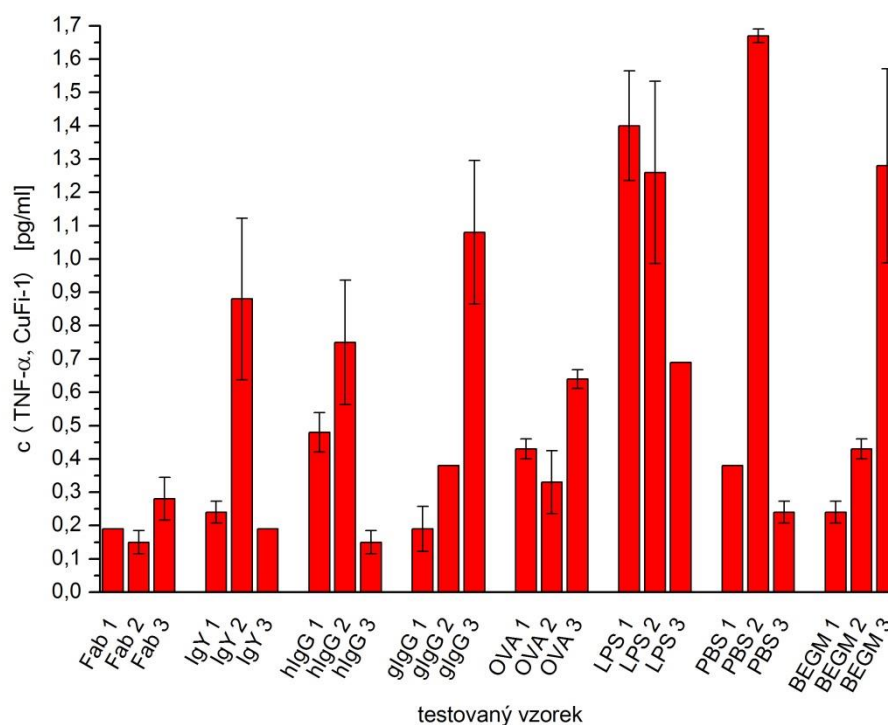
4.3.2 Vliv proteinových vzorků na produkci cytokinů

Byl pozorován vliv expozice proteinovým vzorkům na produkci cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a růstového faktoru GM-CSF. Koncentrace uvedených analytů v buněčném médiu v každé jamce byla měřena ve dvou nezávislých stanoveních metodou Bio-Plex. Stanovení probíhalo na přístroji Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader ve spolupráci s RNDr. Jindrou Vrzalovou, PhD. z Laboratoře imunochemické diagnostiky Fakultní nemocnice Plzeň.

4.3.2.1 Koncentrace zánětlivého cytokinu TNF- α

Výsledky stanovení cytokinu TNF- α produkovaného buňkami CuFi-1 uvádí Obr. 21, str. 78. Nejvyšší produkce TNF- α buňkami CuFi-1 bylo dosaženo expozicí fosfátovému pufru (1,67 pg/ml, viz Obr. 21, PBS 2, str. 78). Jednalo se pouze o individuální hodnotu. Zvýšená produkce TNF- α byla zaznamenána po stimulaci buněk LPS (viz Obr. 21, LPS 1 a 2, str. 78) a v individuálním případě po působení média BEGM (viz Obr. 21, BEGM, str. 78).

Výsledky stanovení TNF- α produkovaného buňkami A549 a NuLi-1 nejsou uvedeny, jelikož koncentrace nedosáhla minimální hranice potřebné pro detekci (A549: 0,52 pg/ml, NuLi-1: 0,58 pg/ml).

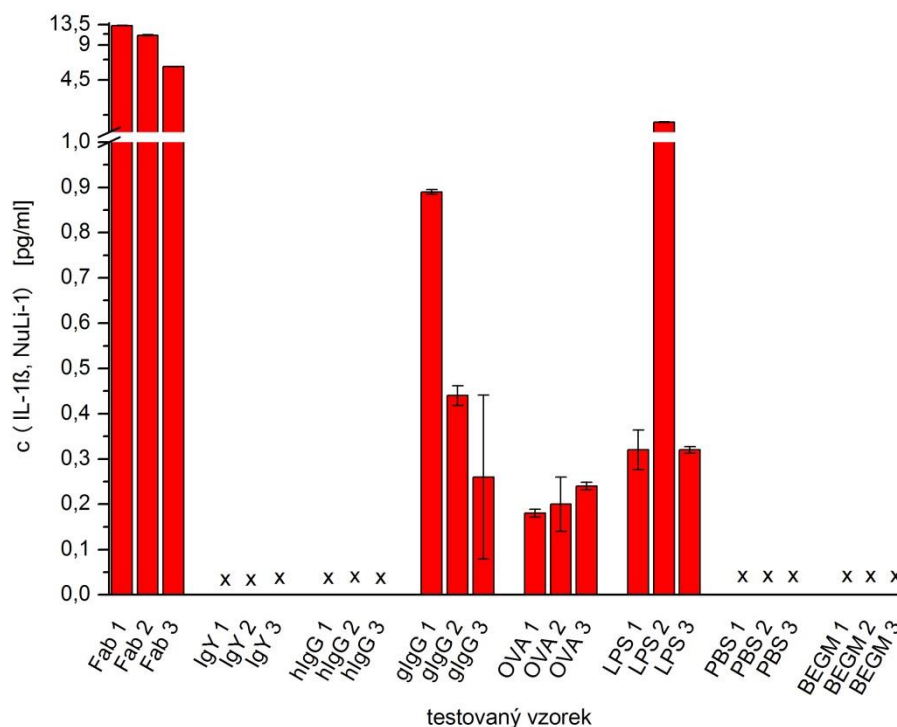


Obr. 21: Koncentrace cytokinu TNF- α produkovaného buňkami CuFi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace TNF- α v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1.

4.3.2.2 Koncentrace zánětlivého cytokinu IL-1 β

Výsledky stanovení cytokinu IL-1 β produkovaného buňkami NuLi-1 uvádí Obr. 22, str. 79. Nejvyšší produkce IL-1 β buňkami NuLi-1 byla změřena po působení Fab fragmentů (viz Obr. 22, Fab 1 – 3, str. 79). Vysoká koncentrace IL-1 β byla pozorována též v jednom případě po stimulaci pomocí LPS (viz Obr. 22, LPS 2, str. 79). V jamkách se vzorky IgY, hIgG, PBS a BEGM nedosáhla koncentrace IL-1 β hranice

potřebné pro detekci (pro vzorky Fab – gIgG: 0,20 pg/ml, pro vzorky OVA – BEGM: 0,17 pg/ml).

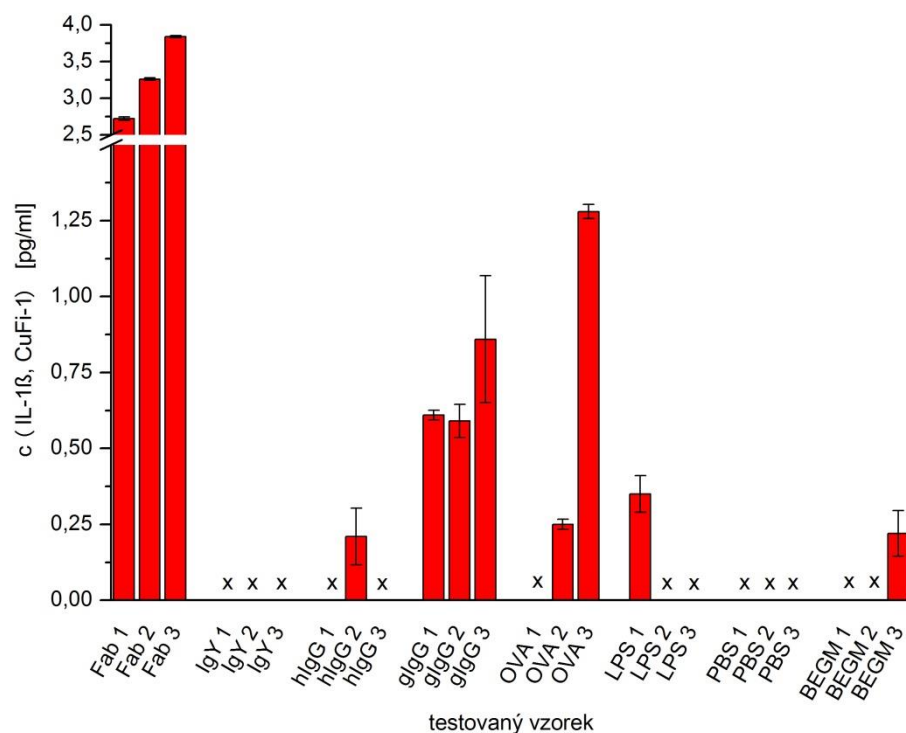


Obr. 22: Koncentrace cytokinu IL-1 β produkovaného buňkami NuLi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace IL-1 β v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky NuLi-1. **x** – hodnota pod hranicí detekce (pro vzorky Fab – gIgG: 0,20 pg/ml, pro vzorky OVA – BEGM: 0,17 pg/ml)

Stanovení koncentrace zánětlivého cytokinu IL-1 β produkovaného buňkami CuFi-1 uvádí Obr. 23, str. 80. Nejvyšší produkce IL-1 β buňkami CuFi-1 bylo dosaženo expozicí Fab fragmentům (Obr. 23, Fab 1 – 3, str. 80). Vysoká koncentrace IL-1 β byla pozorována v ojedinělém případě po stimulaci pomocí OVA (viz Obr. 23, OVA 3, str. 80.).

V některých jamkách stimulovaných IgY, hIgG, LPS, PBS a BEGM a v jamce se vzorkem OVA 1 nedosáhla koncentrace IL-1 β hranice potřebné pro detekci (0,17 pg/ml).

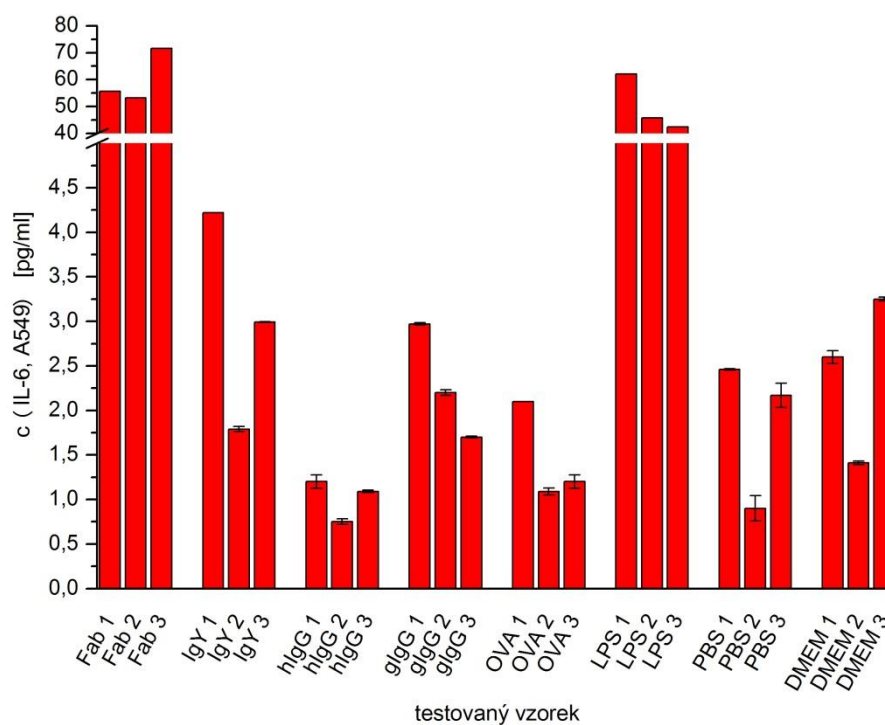
Výsledky stanovení IL-1 β produkovaného buňkami A549 nejsou uvedeny, jelikož koncentrace nedosáhla minimální hranice potřebné pro detekci (0,2 pg/ml).



Obr. 23: Koncentrace cytokinu IL-1 β produkovaného buňkami CuFi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace IL-1 β v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1. **x** – hodnota pod hranicí detekce (0,17 pg/ml)

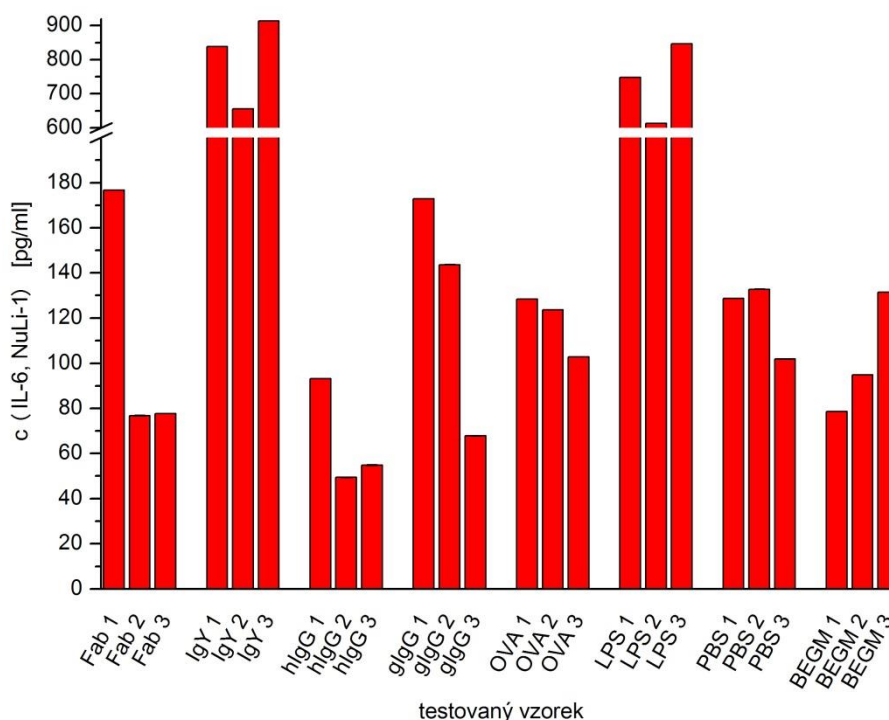
4.3.2.3 Koncentrace zánětlivého cytokinu IL-6

Stanovení cytokinu IL-6 produkovaného buňkami A549 je znázorněno na Obr. 24. Stimulace buněk A549 pomocí Fab fragmentů a LPS vyvolala vysokou produkci tohoto cytokinu (viz Obr. 24 Fab 1 – 3, LPS 1 – 3).



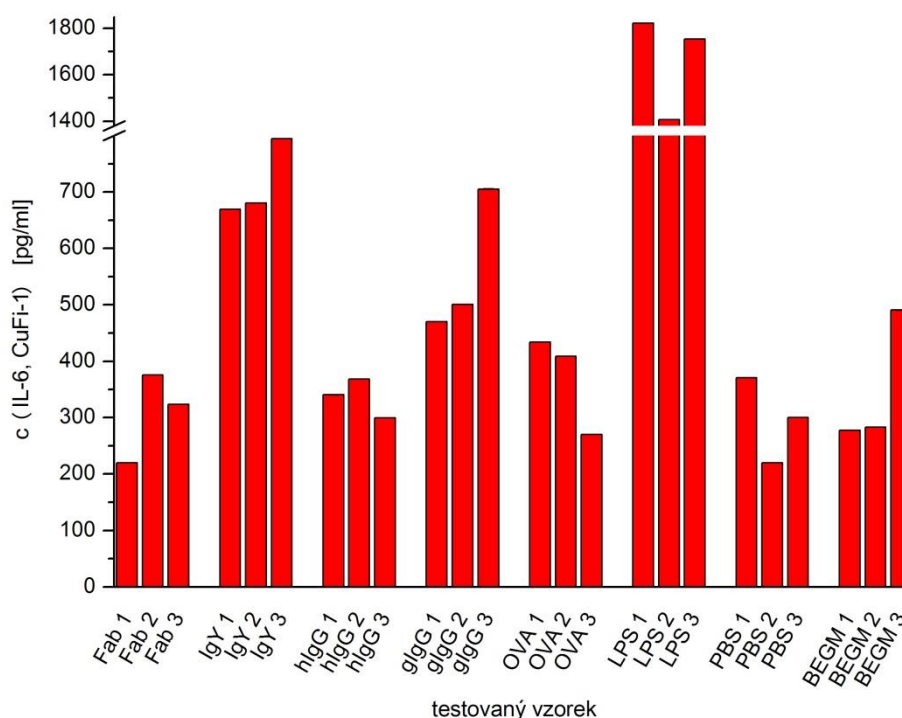
Obr. 24: Koncentrace cytokinu IL-6 produkovaného buňkami A549. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace IL-6 v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **DMEM** – kultivačnímu médiu pro buňky A549.

Koncentraci cytokinu IL-6 produkovaného buňkami NuLi-1 uvádí Obr. 25, str. 82. Stimulované buňky NuLi-1 produkovaly nejvíce IL-6 v případě působení IgY (viz Obr. 25, IgY 1 – 3, str. 82) a LPS (viz Obr. 25, LPS 1 – 3, str. 82).



Obr. 25: Koncentrace cytokinu IL-6 produkovaného buňkami NuLi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace IL-6 v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky NuLi-1.

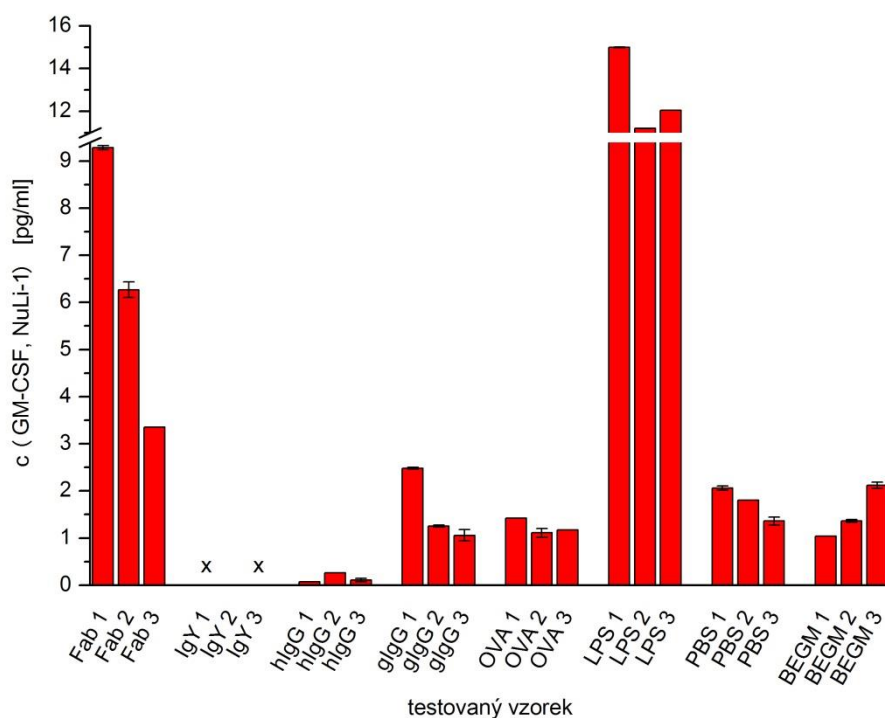
Výsledky stanovení cytokinu IL-6 produkovaného buňkami CuFi-1 uvádí Obr. 26, str. 83. Nejvyšší produkce cytokinu IL-6 buňkami CuFi-1 bylo dosaženo stimulací pomocí LPS (viz Obr. 26, LPS 1 – 3, str. 83). Vysoká koncentrace IL-6 byla pozorována po expozici IgY (viz Obr. 26, IgY 1 – 3, str. 83) a v individuálním případě po působení gIgG (viz Obr. 26, gIgG 3, str. 83)



Obr. 26: Koncentrace cytokinu IL-6 produkovaného buňkami CuFi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace IL-6 v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1.

4.3.2.4 Koncentrace růstového faktoru GM-CSF

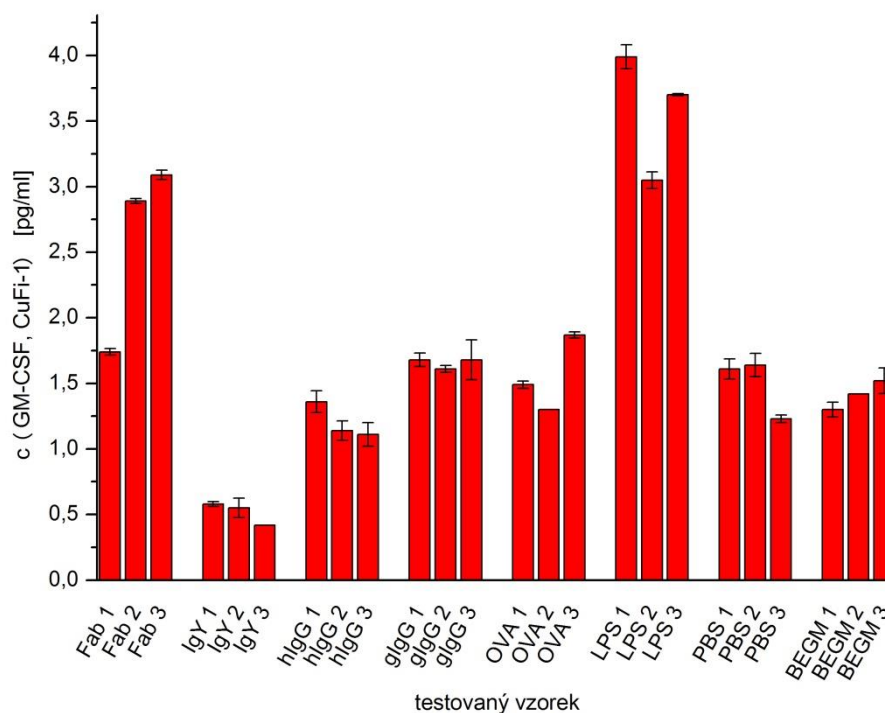
Stanovení koncentrace růstového faktoru GM-CSF po stimulaci buněk NuLi-1 uvádí Obr. 27, str. 84. Buňky NuLi-1 produkovaly nejvíce GM-CSF v případě působení LPS (viz Obr. 27, LPS 1 – 3, str. 84.). Vysoká koncentrace GM-CSF byla pozorována po expozici Fab fragmentům (viz Obr. 27, Fab 1 a 2, str. 84.). V některých jamkách stimulovaných IgY nedosáhl obsah GM-CSF hranice potřebné pro detekci (viz Obr. 27, IgY 1 a 3, str. 84.). Koncentrace GM-CSF ve vzorku IgY 2 byla nulová.



Obr. 27: Koncentrace růstového faktoru GM-CSF produkovaného buňkami NuLi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Hodnoty získané v triplicátu nebyly průměrovány vzhledem k poměrně značnému rozptylu. Koncentrace GM-CSF v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky NuLi-1. **x** – hodnota pod hranicí detekce (nezjištěna)

Výsledky stanovení růstového faktoru GM-CSF produkovaného buňkami CuFi-1 ukazuje Obr. 28, str. 85. S výjimkou působení Fab fragmentů a LPS byly hodnoty získané z triplicátů srovnatelné. Nejvyšší produkce růstového faktoru GM-CSF stimulovanými buňkami CuFi-1 bylo dosaženo pomocí působení LPS (viz Obr. 28, LPS 1 – 3, str. 85.). Vysoká koncentrace GM-CSF byla pozorována ve dvou případech po expozici Fab fragmentům (viz Obr. 28, Fab 2 a 3, str. 85.).

Výsledky koncentrace faktoru GM-CSF produkovaného buňkami A549 nejsou uvedeny, jelikož množství analytu nedosáhlo minimální hranice potřebné pro detekci. Tento limit nebyl experimentálně stanoven, protože obsah GM-CSF v nejzředěnějším standardu nebyl přístrojem vyhodnocen. Koncentrace GM-CSF v druhém nejzředěnějším standardu byla 0,56 pg/ml.



Obr. 28: Koncentrace růstového faktoru GM-CSF produkovaného buňkami CuFi-1. Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace GM-CSF v každé jamce byla stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do grafu byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1.

5 Diskuze

Slepičí žloutkové imunoglobuliny by se z dlouhodobého hlediska mohly stát jednoduchým a levným prostředkem pro ochranu před infekcemi oportunními patogeny vzhledem k mnoha výhodám, které souvisí nejen s jejich snadnou dostupností, ale také s vysokou produkcí. Protože záměrem práce je zjistit možný zánětlivý vliv slepičích protilátek na respirační trakt, byly použity dva modely: *in vivo* efekt inhalace proteinových vzorků na potkany kmene Wistar a *ex vivo* vliv expozice vybraných proteinů na různé druhy lidských epitelálních plicních buněk. Vedle IgY byly za testované proteiny zvoleny jejich Fab fragmenty a OVA.

Vzhledem k možnosti, že by sacharidy přítomné na Fc fragmentu protilátek mohly vyvolávat zánětlivé reakce, byla příprava vzorku čistých Fab fragmentů důležitým krokem. Rozštěpení intaktní molekuly IgY vede ke vzniku bifunkčních Fab a Fc fragmentů.^{84,97} Působení papainu bylo účinné a molekula IgY byla rozštěpena na Fab fragment a Fc fragment. Dále bylo potřeba ze směsi účinně oddělit Fab fragmenty. Toho bylo dosaženo chromatografickou separací na iontoměničích DEAE, pomocí které byly připraveny frakce Fab fragmentů. Přítomnost Fab ve vzorku těchto fragmentů (vzniklých spojením frakcí Fab) byla prokázána technikou „Western blot“ pomocí specifické protilátky proti Fab fragmentu. Tyto vzorky obsahovaly pouze malá množství kontaminantů o podobné molekulové hmotnosti a sacharidovém složení, jaké má Fc fragment. Jejich přítomnost byla rovněž potvrzena technikou „Western blot“ za pomoci detekce sacharidů konkanavalinem A. Kontaminantou mohl být nedostatečně oddělený Fc fragment, nebo produkt dalšího nespecifického enzymového štěpení. Bylo též potvrzeno, že se ve vzorku IgY vyskytují odštěpené Fab fragmenty. Ve vzorku IgY byl rovněž pozorovatelný vznik agregátů. Tyto dvě skutečnosti mohou souviset s fyzikální nestabilitou protilátek, která se projevuje fragmentací a agregací molekul.⁹⁶ Tyto jevy byly pozorovány při dlouhodobém skladování a opakovaném temperování na laboratorní teplotu a opětovném chlazení. Díky tomu může dojít k odštěpení různých částí imunoglobulinu, např. lehkých řetězců nebo celého Fab fragmentu. Agregace také souvisí s koncentrací proteinu a může vést ke snížení aktivity a zvýšení imunogenicity.

Existuje řada studií, které se zabývají inhalačně podanými proteinovými antigeny. Většina z nich však využívá předchozí senzitivace zvířete daným proteinem, jelikož je jejich cílem objasnit míru produkce protilátek proti danému antigenu. Touto problematikou se zabývali také McMenemyová a Holt, kteří inhalaci OVA zkoumali za různých podmínek.⁹⁸ Vybraná skupina potkanů kmene Wistar byla denně exponována aerosolu s obsahem OVA po dobu dvou týdnů, další skupina byla podrobena šestitýdennímu experimentu s inhalací stejného vzorku pouze jednou týdně. Poslední skupina zvířat inhalovala uvedený aerosol jeden den v týdnu po dobu až šesti měsíců. Všechna zvířata však byla před započítím inhalačního experimentu intraperitoneálně imunizována OVA.⁹⁸ Po ukončení experimentu byla měřena především míra odpovědi Tc lymfocytů. Nedošlo však k analýze hladiny zánětlivých cytokinů a růstových faktorů. Proto byla tato diplomová práce mimo jiné zaměřena na sledování možných změn po expozici OVA. Potenciální vliv OVA na vyvolání zánětlivých změn plicní tkáně bez předchozí senzitivace v publikovaných studiích nebyl objasněn. Pro případ, že by jeho schopnost vyvolat produkci zánětlivých cytokinů byla vysoká, byl zahrnut do našich expozičních experimentů. Dalším důvodem byla možnost kontaminace vzorku IgY ovalbuminem. Ta by mohla poskytnout nevěrohodné výsledky, které by vedly k nevhodné interpretaci hodnot vyvolaných IgY.

Inhalační experiment provedený na potkanech kmene Wistar byl vyhodnocen komplexně z několika pohledů: měřením koncentrace vybraných zánětlivých cytokinů a růstových faktorů v BAL a krevním séru metodou Bio-Plex, histologickým vyšetřením exponované plicní tkáně a cytologickou analýzou BAL. Pro expozici byly vybrány připravené Fab fragmenty, molekuly IgY, potenciální kontaminanta vzorku IgY ovalbumin a kontrolní ředící PBS. Po ukončení experimentu byla nejdříve potvrzena tvorba protilátek proti inhalovaným antigenům v krevním séru pomocí metody ELISA. Jednotlivé proteiny vyvolaly obdobnou produkci specifických protilátek. Dle očekávání nedošlo k produkci protilátek u zvířat inhalujících kontrolní PBS. V krmivu potkanů nebyly přítomny vaječné proteiny, které by mohly ovlivnit výsledné hodnoty. Výsledky potvrdily přítomnost specifických protilátek proti inhalovaným cizorodým proteinům i bez předchozí senzitivace exponovaných zvířat. Na základě tohoto specifického stanovení protilátek v séru byl potvrzen správný průběh inhalační expozice.

Dále byl inhalační experiment vyhodnocen z pohledu přítomnosti zánětlivých cytokinů a růstových faktorů v BAL a krevním séru. Stanovení bylo provedeno metodou Bio-Plex a vyhodnoceny byly zejména cytokiny, které nejčastěji doprovází plicní zánět, mezi něž patří TNF- α , IL-1 β , IL-6 a růstový faktor GM-CSF. Obecně lze konstatovat, že podobně jako v případě detekce protilátek metodou ELISA, byly i u analýzy cytokinů patrné určité rozdíly způsobené biologickou variabilitou v rámci jedné experimentální skupiny. Z dosažených výsledků plyne, že IgY vyvolávají zvýšení koncentrace TNF- α a IL-6 v BAL. Zvýšené zastoupení IL-1 β lze ve vybraných případech pozorovat v BAL po aplikaci Fab fragmentů a OVA. Hodnoty koncentrací IL-1 β v BAL po expozici IgY a PBS jsou nižší. Nízké hodnoty IL-1 β byly naměřeny pro krevní sérum s výjimkou expozice Fab fragmentům, kde pouze v jediném případě dosahuje koncentrace značně vysoké hodnoty. Vysoká hodnota koncentrace GM-CSF v krevním séru byla zjištěna u jednoho potkana inhalujícího OVA. Zvýšené hodnoty koncentrací uvedených cytokinů souvisí zejména s biologickou variabilitou a do určité míry také s reprodukovatelností stanovení. Při analýze často nebylo možno stanovit nízkou koncentraci analytů, zejména v krevním séru, protože jejich koncentrace byly pod mezí detekce metody. Experimentálně zjištěná sérová koncentrace TNF- α a IL-6 u kontrolní skupiny potkanů Wistar dosáhla dle Duansaka 80 pg/ml, resp. 60 pg/ml.⁹⁹ V této práci bylo však množství cytokinů TNF- α a IL-6 ve vzorku krevního séra nižší, než minimální koncentrace potřebná vůbec pro detekci (2,2 pg/ml, resp. 8,1 pg/ml). Při nízkých hodnotách koncentrace cytokinů se naměřené hodnoty v duplikátech značně lišily, a tak tato data nebyla průměrována. Za pozornost stojí produkce GM-CSF v krevním séru potkana č. 2 a v BAL potkana č. 1 zvýšená ovalbuminem. Tento růstový faktor je důležitým činitelem pro zrání a diferenciaci progenitorů na makrofágy.⁵⁴ Jeho individuální zvýšená produkce v laváži a krevním séru poukazuje na souvislost s přítomností atypických makrofágů s pěnitou cytoplazmou v plicní tkáni.

Na základě mikroskopické analýzy a diferenciálního odečtu alveolárních makrofágů a lymfocytů v plicní laváži nebyla potvrzena přítomnost akutního zánětu u žádného pokusného jedince. Koncentrace alveolárních makrofágů v BAL většinou dosahovala srovnatelných hodnot. Zvýšená produkce lymfocytů byla pozorována u obou jedinců inhalujících OVA. Vzhledem ke skutečnosti, že lymfocyty a aktivované makrofágy produkují cytokiny TNF- α , IL-1 β a IL-6, může individuálně zvýšený výskyt těchto

cytokinů souviset s vyšší koncentrací lymfocytů v laváži.¹⁰⁰ Např. v BAL potkana č. 1 inhalujícího OVA byla pozorována zvýšená produkce IL-1 β a u obou jedinců byla zjištěna koncentrace TNF- α vyšší, než u jedinců inhalujících PBS.

Výsledky histologického vyšetření exponovaných plic neprokázaly přítomnost zánětlivých změn plicního parenchymu. Plicní sklípky všech potkanů měly normální strukturu a přiměřenou vzdušnost a neobsahovaly zánětlivý exsudát. V plicním parenchymu vybraných zvířat exponovaných Fab fragmentům, IgY a PBS bylo pozorováno malé množství alveolárních makrofágů, jejichž výskyt je však běžný. U potkanů inhalujících OVA byly zjištěny skupinky alveolárních makrofágů s pěnitou cytoplazmou, což naznačuje iniciaci blíže neurčených změn plicní tkáně. Na základě histologického vyšetření byla vyloučena přítomnost patologických zánětlivých změn plicního parenchymu po inhalační aplikaci IgY a Fab.

V experimentu na buňkách A549, NuLi-1 a CuFi-1 byl zjišťován vliv slepičích IgY a Fab fragmentů v porovnání se savčími protilátkami, konkrétně kozími a lidskými IgG na produkci zánětlivých cytokinů. Do testování byl rovněž zahrnut OVA a bakteriální LPS, způsobující produkci cytokinů již při nízkých koncentracích.¹⁰¹ Stanovení cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a faktoru GM-CSF v buněčném médiu bylo provedeno metodou Bio-Plex. Současné byly určeny počty buněk přítomných při expozici (viz Přílohy č. 10, 11 a 12). Stanovené počty buněk však byly ve většině případů nepřesné, a tak nebylo vhodné koncentraci cytokinů normalizovat na počty buněk. Došlo pravděpodobně k neúplnému oddělení všech buněk z povrchu jamky.

V porovnání s výsledky získanými v inhalačním experimentu poskytly výsledky stanovení koncentrace buněčných cytokinů v případě dvou nezávislých měření podobné hodnoty, které bylo možno průměrovat. Data získaná z jednotlivých triplicátů se v některých případech velmi odlišovala, zejména u cytokinu TNF- α . Měření obsahu cytokinu IL-1 β a TNF- α bylo ovlivněno nízkým obsahem analytu ve vzorku. Dobře stanovitelným analytem byl IL-6, jehož množství bylo poměrně vysoké a měření bylo provedeno s vyšší přesností. Obsah faktoru GM-CSF v analyzovaném vzorku byl rovněž dostačující pro přesné stanovení.

Nádorová linie A549 produkovala uvedené cytokiny ve velmi nízkém množství, které neumožnilo jejich detekci. Jediným stanovitelným analytem byl IL-6. Jeho zvýšená koncentrace byla pozorována v případě působení Fab fragmentů a byla srovnatelná s LPS, který sloužil jako pozitivní kontrola. Ostatní vzorky vyvolaly nižší produkci IL-6. Schopnost gIgG vyvolat produkci zánětlivých cytokinů byla v porovnání s hIgG vyšší. Tento výsledek nejspíše souvisí s tím, že kozí imunoglobuliny jsou pro lidské buňky cizorodé.

Imortalizovaná linie buněk zdravého jedince, NuLi-1, sekretovala měřitelná množství cytokinů IL-1 β , IL-6 a faktoru GM-CSF. V případě měření TNF- α byla zjištěna jeho nejvyšší koncentrace po indukci Fab fragmenty a jednom případě též po stimulaci LPS. Imunoglobuliny IgY, hIgG, a kontrolní PBS a BEGM nevyvolaly produkci IL-1 β . Obdobná závislost platí v případě faktoru GM-CSF. Nejvyšší množství GM-CSF je sekretováno zejména buňkami vystavenými LPS. Zvýšené hodnoty způsobuje také indukce Fab fragmenty. Koncentrace GM-CSF vyvolaná působením IgY je nulová. Zbývající stimulanty vyvolaly produkci nízkého množství GM-CSF. Tvorba cytokinu IL-6 vykazuje opačný trend. Zde dosahuje stimulace pomocí IgY a LPS nejvyšších hodnot. Na základě stanovených koncentrací vybraných cytokinů lze konstatovat, že nejefektivnějším stimulantem byl LPS. Buňky NuLi-1 reagovaly nízkou produkcí zánětlivých cytokinů na přítomnost hIgG, které jsou pro lidské tělo přirozené. Cizorodé bílkoviny kozího IgG vykazovaly oproti hIgG vyšší schopnost vyvolat produkci zánětlivých cytokinů. Vyšší hodnoty IL-1 β a GM-CSF vyvolané působením OVA naznačuje možnost potenciálního nebezpečí, které by souviselo s kontaminací IgY preparátu ovalbuminem.

U buněčné linie CuFi-1 byly vyhodnoceny všechny čtyři typy zánětlivých cytokinů. I přesto, že TNF- α poskytl nejednotné výsledky, lze konstatovat, že buňky CuFi-1 byly efektivně stimulovány pomocí LPS. Produkce TNF- α po stimulaci Fab fragmenty a IgY byla nízká. Slepíci IgY rovněž vyvolaly sekreci malého množství GM-CSF a nezpůsobily produkci IL-1 β . Cytokin IL-6 byl naopak pomocí IgY indukován, zatímco Fab fragmenty vyvolaly tvorbu nižších hladin IL-6. Fab fragmenty indukovaly zvýšenou tvorbu IL-1 β . Zajímavé je srovnání produkce IL-1 β v případě působení vzorku OVA 3 (Obr. 23 OVA 3, str. 80) v porovnání se vzorkem IgY. Vysoká hodnota zjištěná po indukci OVA vylučuje

jeho přítomnost ve vzorku IgY, neboť testované imunoglobuliny nezpůsobily produkci tohoto cytokinu.

Z údajů získaných v pokusu *ex vivo* plyne několik závěrů. Ve vybraných případech došlo k indukci zánětlivých cytokinů po stimulaci pomocí Fab fragmentů. Tento výsledek může být způsoben nízkou výchozí koncentrací testovaného vzorku, který byl následně ředěn menším množstvím příslušného média, než v případě ostatních působících proteinů. Lze tedy předpokládat, že exponované buňky nebyly přítomny v ideálním kultivačním prostředí. Tato situace mohla ovlivnit produkci zánětlivých cytokinů a způsobit tak vznik falešně pozitivních hodnot. Dále lze prohlásit, že slepičí IgY nezpůsobily ve většině případů vysokou produkci zánětlivých cytokinů. Rovněž bylo zjištěno, že kozí IgG, který je pro lidské buňky cizorodým činitelem, vyvolává vyšší produkci zánětlivých cytokinů, než lidský IgG. Dále je prokazatelné, že bakteriální LPS působí jako efektivní stimulant produkce zánětlivých cytokinů. V poslední řadě je důležité zohlednit působení PBS a příslušného média. Oba vzorky vyvolaly ve většině případů shodný efekt.

Důležitým kritériem pro určení možného rizika, které by mohlo souviset s inhalačním podáním IgY vybraných látek je porovnání koncentrace jimi indukovaných cytokinů s fyziologickým množstvím těchto faktorů v lidském krevním séru. Experimentální měření provedené Kimem vyhodnocuje kromě jiných cytokinů také sérové hladiny TNF- α (3,21 pg/ml), IL-1 β (2,04 pg/ml) a faktoru GM-CSF (40,9 pg/ml).¹⁰² S ohledem na tyto údaje lze tvrdit, že fyziologické hladiny byly překročeny pouze ve dvou případech, a to u sekrece cytokinu IL-1 β po indukci pomocí Fab fragmentů. Výsledky dokazují, že žádná z testovaných proteinových látek nevyvolává buněčné pochody spojené se zánětlivými procesy.

Protože byla koncentrace stanovených analytů s ohledem na jednotlivé testované látky velmi různorodá, nelze z *ex vivo* experimentu, s výjimkou LPS, jednoznačně usuzovat na schopnost látky stimulovat buňky k produkci zánětlivých cytokinů. Vhodnějším experimentálním modelem pro objasnění nejen imunogenicity, ale také možného zánětlivého vlivu testovaných látek na plicní tkáň, je systém *in vivo*, který díky komplexnímu působení vzájemně propojených imunitních mechanismů věrohodněji vystihuje situaci v lidském těle.

6 Souhrn

In vivo a *ex vivo* působení slepičích imunoglobulinů typu Y a z nich připravených Fab fragmentů pomohlo objasnit jejich zánětlivý vliv na respirační trakt. V této práci bylo dosaženo následujících závěrů:

- V osmadvacetidenním inhalačním experimentu na potkanech kmene Wistar byly testovány IgY, z nich připravené Fab fragmenty a možná kontaminanta OVA.
- Na základě přítomnosti imunochemicky stanovených specifických protilátek proti inhalovaným proteinům v krevním séru lze potvrdit efektivní průběh každodenní inhalační expozice.
- Koncentrace zánětlivých cytokinů v získaném krevním séru a BAL vyloučila společně s cytologickou analýzou plicní laváže zánětlivý vliv IgY a Fab fragmentů a jejich rozdílné hodnoty poukázaly na biologickou variabilitu exponovaných jedinců.
- Plicní tkáň exponovaná IgY a Fab fragmentům nevykazovala histologicky prokazatelné známky přítomnosti zánětlivých změn, na rozdíl od tkáně vystavené působení OVA.
- IgY nezpůsobil ve většině testovaných případů zvýšenou produkci zánětlivých cytokinů buňkami A549, NuLi-1 a CuFi-1, na rozdíl efektivně stimulujícího LPS.

Seznam použité literatury

Literatura je citována dle formátu American Chemical Society.

- (1) Stříž, I. Respirační imunita. *Interní medicína pro praxi* **2008**, 10, 184–187.
- (2) Zhang, P.; Summer, W. R.; Bagby, G. J.; Nelson, S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunological Reviews* **2000**, 173, 39–51.
- (3) Mercer, R. R.; Crapo, J. D. Normal anatomy and defense mechanisms of the lung v knize *Textbook of Pulmonary Diseases*; Lippincott-Raven: Philadelphia, 1998; str. 23–45.
- (4) Coonrod, J. The role of extracellular bactericidal factors in pulmonary host defense. *Seminars in Respiratory Infections* **1986**, 1, 118–129.
- (5) Kaltreider, H. B. Immune mechanisms in the normal lung. *Seminars in Respiratory Medicine* **1991**, 12, 143–155.
- (6) Martin, T. R.; Mathison, J. C.; Tobias, P. S.; Leturcq, D. J.; Moriarty, A. M.; Maunder, R. J.; Ulevitch, R. J. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lung. *Journal of Clinical Investigation* **1992**, 90, 2209–2219.
- (7) Hiratsuka, T.; Nakazato, M.; Date, Y.; Ashitani, J. I.; Minematsu, T.; Chino, N.; Matsukura, S. Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, 249, 943–947.
- (8) Schnapp, D.; Harris, A. Antibacterial peptides in bronchoalveolar lavage fluid. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1998**, 19, 352–356.
- (9) Ashitani, J.; Mukae, H.; Nakazato, M.; Ihi, T.; Mashimoto, H.; Kadota, J.; Matsukura, S. Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis. *European Respiratory Journal* **1998**, 11, 104–111.
- (10) McCray Jr, P. B.; Bentley, L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1997**, 16, 343–349.
- (11) Bals, R.; Wang, X. R.; Zasloff, M.; Wilson, J. M. The peptide antibiotic IL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 9541–9546.
- (12) Crouch, E. C. Collectins and pulmonary host defense. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1998**, 19, 177–201.

- (13) Rogan, M. P.; Geraghty, P.; Greene, C. M.; Neill, S. J. O.; Taggart, C. C. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respiratory Research* **2006**, *7*, 1–11.
- (14) Ganz, T.; Lehrer, R. I. Defensins. *Pharmacology & Therapeutics* **1995**, *66*, 191–205.
- (15) Goldman, M. J.; Anderson, G. M.; Stolzenberg, E. D.; Kari, U. P.; Zasloff, M.; Wilson, J. M. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **1997**, *88*, 553–560.
- (16) Smith, J. J.; Travis, S. M.; Greenberg, E. P.; Welsh, M. J. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **1996**, *85*, 229–236.
- (17) Lehrer, R. I.; Lichtenstein, A. K.; Ganz, T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual Review of Immunology* **1993**, *11*, 105–128.
- (18) Benne, C. A.; Kraaijeveld, C. A.; Van Strijp, J. A. G.; Brouwer, E.; Harmsen, M.; Verhoef, J.; Van Iwaarden, J. F. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *Journal of Infectious Diseases* **1995**, *171*, 335–341.
- (19) Kuan, S. F.; Persson, A.; Parghi, D.; Crouch, E. Lectin-mediated interactions of surfactant protein D with alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1994**, *10*, 430–436.
- (20) Gaynor, C. D.; McCormack, F. X.; Voelker, D. R.; McGowan, S. E.; Schlesinger, L. S. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *The Journal of Immunology* **1995**, *155*, 5343–5351.
- (21) Madan, T.; Eggleton, P.; Kishore, U.; Strong, P.; Aggrawal, S. S.; Sarma, P. U.; Reid, K. B. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infection and Immunity* **1997**, *65*, 3171–3179.
- (22) O’Riordan, D. M.; Standing, J. E.; Kwon, K. Y.; Chang, D.; Crouch, E. C.; Limper, A. H. Surfactant protein D interacts with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **1995**, *95*, 2699–2710.
- (23) Malhotra, R.; Haurum, J.; Thiel, S.; Jensenius, J. C.; Sim, R. B. Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A). *Bioscience Reports* **1993**, *13*, 79–90.
- (24) Crouch, E. C.; Persson, A.; Griffin, G. L.; Chang, D.; Senior, R. M. Interactions of pulmonary surfactant protein D (SP-D) with human blood leukocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1995**, *12*, 410–415.

- (25) Wright, J. R.; Youmans, D. C. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **1993**, 264, L338–L344.
- (26) Siveen, K. S.; Kuttan, G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunology Letters* **2009**, 123, 97–102.
- (27) Sibille, Y.; Reynolds, H. Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *The American Review of Respiratory Disease* **1990**, 141, 471–501.
- (28) Cohen, A. B.; Rossi, M. Neutrophils in normal lungs. *The American Review of Respiratory Disease* **1983**, 127, S3–S9.
- (29) Faurschou, M.; Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* **2003**, 5, 1317–1327.
- (30) Hořejší, V.; Bartůňková, J. *Základy imunologie*; Triton: Praha, 2009.
- (31) Kindt, T. J.; Osborne, B. A.; Goldsby, R. A. *Kuby Immunology*; W. H. Freeman & Company: New York, 2006.
- (32) Krejsek, J.; Kopecký, O. *Klinická imunologie*; Nucleus: Hradec Králové, 2004.
- (33) Delclaux, C.; Azoulay, E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *European Respiratory Journal* **2003**, 22, 10s–14s.
- (34) Nelson, S.; Bagby, G. J.; Bainton, B. G.; Wilson, L. A.; Thompson, J. J.; Summer, W. R. Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *Journal of Infectious Diseases* **1989**, 159, 189–194.
- (35) Boujoukos, A. J.; Martich, G. D.; Supinski, E.; Suffredini, A. F. Compartmentalization of the acute cytokine response in humans after intravenous endotoxin administration. *Journal of Applied Physiology* **1993**, 74, 3027–3033.
- (36) Kolls, J. K.; Lei, D.; Nelson, S.; Summer, W. R.; Greenberg, S.; Beutler, B. Adenovirus-mediated blockade of tumor necrosis factor in mice protects against endotoxic shock yet impairs pulmonary host defense. *Journal of Infectious Diseases* **1995**, 171, 570–575.
- (37) Standiford, T. J.; Kunkel, S. L.; Greenberger, M. J.; Laichalk, L. L.; Strieter, R. M. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *Journal of Leukocyte Biology* **1996**, 59, 24–28.
- (38) Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Sher, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T

- cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of Immunology* **1996**, 157, 798–805.
- (39) Van der Poll, T.; Marchant, A.; Keogh, C. V.; Goldman, M.; Lowry, S. F. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* **1996**, 174, 994–1000.
 - (40) Hogan, S. P.; Foster, P. S.; Tan, X.; Ramsay, A. J. Mucosal IL-12 gene delivery inhibits allergic airways disease and restores local antiviral immunity. *European Journal of Immunology* **1998**, 28, 413–423.
 - (41) Qureshi, M. H.; Zhang, T.; Koguchi, Y.; Nakashima, K.; Okamura, H.; Kurimoto, M.; Kawakami, K. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *European Journal of Immunology* **1999**, 29, 643–649.
 - (42) Wakeham, J.; Wang, J.; Magram, J.; Croitoru, K.; Harkness, R.; Dunn, P.; Xing, Z. Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice. *The Journal of Immunology* **1998**, 160, 6101–6111.
 - (43) Greenberger, M. J.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M.; Lukacs, N. W.; Bramson, J.; Gauldie, J.; Standiford, T. J. IL-12 gene therapy protects mice in lethal *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Immunology* **1996**, 157, 3006–3012.
 - (44) Brieland, J. K.; Remick, D. G.; LeGendre, M. L.; Engleberg, N. C.; Fantone, J. C. In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous interleukin-12. *Infection and Immunity* **1998**, 66, 65–69.
 - (45) Neveu, W. A.; Allard, J. B.; Dienz, O.; Wargo, M. J.; Ciliberto, G.; Whittaker, L. A.; Rincon, M. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *The Journal of Immunology* **2009**, 183, 1732–1738.
 - (46) Mukaida, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2003**, 284, L566–L577.
 - (47) Murugan, V.; Biosys, J.; Peck, M. J.; Morris, P. Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils. *Experimental Lung Research* **2009**, 35, 439–485.
 - (48) Panzner, P. Imunologické základy alergické odpovědi v knize *Alergologie*; Houdek, L., Ed.; Galén: Praha, 2004.
 - (49) Netea, M. G.; Simon, A.; Van de Veerdonk, F.; Kullberg, B. J.; Van der Meer, J. W.; Joosten, L. A. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathogens* **2010**, 6, e1000661.

- (50) Borish, L.; Steinke, J. W. Interleukin-33 in asthma: How big of a role does it play? *Current Allergy and Asthma Reports* **2011**, *11*, 7–11.
- (51) Isozaki, T.; Otsuka, K.; Sato, M.; Takahashi, R.; Wakabayashi, K.; Yajima, N.; Kasama, T. Synergistic induction of CX3CL1 by interleukin-1 β and interferon- γ in human lung fibroblasts: involvement of signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathways. *Translational Research* **2011**, *157*, 64–70.
- (52) Roilides, E.; Walsh, T. J.; Pizzo, P. A.; Rubin, M. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *Journal of Infectious Diseases* **1991**, *163*, 579–583.
- (53) Tazi, A.; Nioche, S.; Chastre, J.; Smiejan, J. M.; Hance, A. J. Spontaneous release of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) by alveolar macrophages in the course of bacterial pneumonia and sarcoidosis: endotoxin-dependent and endotoxin-independent G-CSF release by cells recovered by bronchoalveolar lavage. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1991**, *4*, 140–147.
- (54) Dranoff, G.; Crawford, A. D.; Sadelain, M.; Ream, B.; Bronson, R. T.; Dickersin, G. R.; Bachurski, C. J.; Mark, E. L.; Whitsett, J. A.; Mulligan, R. C.; Rashid, A.; Mulligan, R. C. Involvement of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Pulmonary Homeostasis. *Science, New Series* **1994**, *264*, 713–716.
- (55) Appay, V.; Rowland-Jones, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology* **2001**, *22*, 83–87.
- (56) Iida, N.; Grotendorst, G. R. Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. *Molecular and Cellular Biology* **1990**, *10*, 5596–5599.
- (57) Papadaki, H. A.; Velegraki, M. The Immunology of the Respiratory System. *Pneumon* **2007**, *20*, 384–394.
- (58) Samitas, K.; Lötvall, J.; Bossios, A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **2010**, *58*, 209–225.
- (59) Riffo-Vasquez, Y.; Pitchford, S.; Spina, D. Cytokines in airway inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2000**, *32*, 833–853.
- (60) Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* **1999**, *340*, 448–454.
- (61) Kunkel, E. J.; Butcher, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* **2002**, *16*, 1–4.
- (62) Vernooij, J. H.; Dentener, M. A.; Van Suylen, R. J.; Buurman, W. A.; Wouters, E. F. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung

- inflammation and persistent pathology. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2002**, 26, 152–159.
- (63) Domenico, P.; Salo, R. J.; Cross, A. S.; Cunha, B. A. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity* **1994**, 62, 4495–4499.
 - (64) Male, D.; Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I. *Immunology*; Elsevier: Toronto, 2006.
 - (65) Atamas, S. P.; Chapoval, S. P.; Keegan, A. D. Cytokines in chronic respiratory diseases. *F1000 Biology Reports* **2013**, 5, 1–12.
 - (66) Schwartz, D. A. Does Inhalation of Endotoxin Cause Asthma? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2001**, 163, 305–306.
 - (67) Tulić, M. K.; Wale, J. L.; Holt, P. G.; Sly, P. D. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2000**, 22, 604–612.
 - (68) Hessel, E. M.; Van Oosterhout, a J.; Hofstra, C. L.; De Bie, J. J.; Garssen, J.; Van Loveren, H.; Verheyen, a K.; Savelkoul, H. F.; Nijkamp, F. P. Bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *European Journal of Pharmacology* **1995**, 293, 401–412.
 - (69) Kennedy, S. M.; Christiani, D. C.; Eisen, E. A.; Wegman, D. H.; Greaves, I. A.; Olenchok, S. A.; Ye, T. T.; Lu, P.-L. Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers. *The American Review of Respiratory Disease* **1987**, 135, 194–200.
 - (70) Schwartz, D. A.; Thorne, P. S.; Yagla, S. J.; Burmeister, L. F.; Olenchok, S. A.; Watt, J. L.; Quinn, T. J. The role of endotoxin in grain dust-induced lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **1995**, 152, 603–608.
 - (71) Milton, D. K.; Wypij, D.; Kriebel, D.; Walters, M. D.; Hammond, S. K.; Evans, J. S. Endotoxin exposure-response in a fiberglass manufacturing facility. *American Journal of Industrial Medicine* **1996**, 29, 3–13.
 - (72) Sripaiboonkij, P.; Phanprasit, W.; Jaakkola, M. S. Respiratory effects of occupational exposures in a milk powder factory. *The European Respiratory Journal* **2008**, 31, 807–814.
 - (73) De Rose, V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* **2002**, 19, 333–340.
 - (74) Elizur, A., Cannon, C. L., & Ferkol, T. W. Airway inflammation in cystic fibrosis. *CHEST Journal* **2008**, 133, 489–495.

- (75) Campodónico, V. L., Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Uluer, A., & Pier, G. B. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends in Molecular Medicine* **2008**, *14*, 120–133.
- (76) Brett, M. M.; Simmonds, E. J.; Ghoneim, a T.; Littlewood, J. M. The value of serum IgG titres against *Pseudomonas aeruginosa* in the management of early pseudomonal infection in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* **1992**, *67*, 1086–1088.
- (77) Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V; Wejåker, P.-E.; Kollberg, H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonology* **2008**, *43*, 892–899.
- (78) Casadevall, A.; Janda, A. Immunoglobulin isotype influences affinity and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 12272–12273.
- (79) Porter, R. R. Structural Studies of Immunoglobulins. *Science* **1973**, *180*, 713–716.
- (80) <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm> (staženo 10.4.2013)
- (81) Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology Reviews* **2004**, *15*, 25–46.
- (82) Gottstein, B.; Hemmeler, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Parasitology Research* **1985**, *71*, 273–276.
- (83) Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. a IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* **1995**, *16*, 392–398.
- (84) Akita, E. M.; Nakai, S. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *Journal of Immunological Methods* **1993**, *162*, 155–164.
- (85) <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm> (staženo 10.4.2013)
- (86) Cheung, G. L. M.; Thomas, T. M.; Rylatt, D. B. Purification of antibody Fab and F(ab')₂ fragments using Gradiflow technology. *Protein Expression and Purification* **2003**, *32*, 135–40.
- (87) Reed, R.; Holmes, D.; Weyers, J.; Jones, A. Analytical Techniques v knize *Practical Skills in Biomolecular Sciences*; Pearson Education Limited: Harlow, 2007.
- (88) <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=7185220A-900F-C194-02CD-8E7FD2EDFC45> (staženo 5.3.2013)

- (89) Oku, H.; Hase, S. Characterization of carbohydrate-binding specificity of concanavalin A by competitive binding of pyridylamino sugar chains. *Journal of Biochemistry* **1992**, *111*, 396–400.
- (90) http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_MultiplexAssayPrinciple.aspx (staženo 5.3.2013)
- (91) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185.aspx> (staženo 11.3.2013)
- (92) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4011.aspx> (staženo 11.3.2013)
- (93) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4013.aspx> (staženo 11.3.2013)
- (94) Hatina, J.; Reischig, J. Molekulární biologie buněčné imortalizace a její vztah ke karcinogenezi. *Klinická onkologie* **2001**, *14*.
- (95) http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/corning_cellbind_polystyrene.aspx (staženo 15.3.2013)
- (96) Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D. L.; King, K.; Nema, S.; Al, W. E. T. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96*, 1–26.
- (97) Bereli, N.; Akgöl, S.; Yavuz, H.; Denizli, A. Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, *97*, 1202–1208.
- (98) McMenamin, C.; Holt, P. G. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8⁺ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4⁺ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression o. *The Journal of Experimental Medicine* **1993**, *178*, 889–899.
- (99) Duansak, D.; Somboonwong, J.; Patumraj, S. Effects of Aloe vera on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **2003**, *29*, 239–246.
- (100) Feghali, C. a; Wright, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **1997**, *2*, d12–26.
- (101) Hansen, L. a; Poulsen, O. M.; Würtz, H. Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the limulus ameocyte lysate assay. *Journal of immunological methods* **1999**, *226*, 49–58.
- (102) Kim, H. O.; Kim, H. S.; Youn, J. C.; Shin, E. C.; Park, S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *Journal of Translational Medicine* **2011**, *9*, 113–119.

Příloha č. 1

Stanovení koncentrace cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a GM-CSF v BAL a krevním séru exponovaných potkanů

Tab. č. 5: Koncentrace cytokinů TNF- α , IL-1 β , IL-6 a faktoru GM-CSF detekovaných v BAL a krevním séru exponovaných potkanů.

Testovaná látka	TNF- α [pg/ml]	IL-1 β [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]	GM-CSF [pg/ml]
STD1	5,54	7,54	22,67	9,56
STD1	x	x	x	x
STD2	x	x	x	x
STD2	7,47	33,87	8,11	1,67
STD3	x	x	x	x
STD3	6,52	42,92	91,53	6,47
STD4	16,57	33,87	36,34	8,4
STD4	28,6	56,69	56,17	14,32
STD5	65,99	61,32	160,75	26,65
STD5	106,06	87,17	278,93	55,14
STD6	225,89	197,8	653,63	105,14
STD6	414,15	698,71	1284,72	290,15
STD7	1011,23	1101,81	2489,8	545,27
STD7	1422,2	1538,34	3724,67	803,5
STD8	3919,41	4079,76	10139,75	1990,39
STD8	*6805.34	*8253.86	*19110.51	*3777.16
sérum Fab A1	x	*7125.64	x	0
sérum Fab A1	x	5150,36	x	4,21
sérum Fab A2	x	264,46	x	10,35
sérum Fab A2	x	517,64	x	6,85
sérum IgY B1	x	56,69	x	9,56
sérum IgY B1	x	80,07	x	4,21
sérum IgY B2	x	125,7	x	1,32
sérum IgY B2	x	162,67	x	1,67
sérum OVA C1	x	20,53	x	5,71
sérum OVA C1	x	x	x	0,64
sérum OVA C2	x	137,94	x	49,42
sérum OVA C2	x	80,07	x	65,82
sérum PBS D1	x	84,8	x	6,47
sérum PBS D1	13,45	103,91	x	6,47
sérum PBS D2	x	1156,8	x	6,85
sérum PBS D2	x	1333,2	x	4,21

sérum kontrola č.1	x	125,7	x	0,64
sérum kontrola č.1	x	137,94	x	x
sérum kontrola č.2	x	182,67	x	3,11
sérum kontrola č.2	x	137,94	x	0,64
BAL Fab A1	3,96	2260,68	26,14	2,02
BAL Fab A1	5,03	243,77	78,77	6,09
BAL Fab A2	4,5	295,78	22,67	2,02
BAL Fab A2	14,64	280,08	49,62	0,64
BAL IgY B1	12,65	220,68	43,02	6,09
BAL IgY B1	25,89	375,46	126,29	3,84
BAL IgY B2	28,6	380,84	75,56	8,78
BAL IgY B2	24,17	338,04	29,57	0,31
BAL OVA C1	15,42	1077,49	81,97	9,56
BAL OVA C1	13,05	311,57	69,13	1,32
BAL OVA C2	13,05	213,03	29,57	x
BAL OVA C2	18,07	243,77	22,67	0,64
BAL PBS D1	7,47	280,08	97,89	x
BAL PBS D1	14,25	269,66	101,06	15,94
BAL PBS D2	7,47	259,27	59,42	4,96
BAL PBS D2	6,52	259,27	113,7	x
BAL kontrola č.1	8,39	445,95	19,16	x
BAL kontrola č.2	18,07	*55672.30	145,12	11,14
BAL kontrola č.2	15,03	202,87	x	x
BAL kontrola č.2	34,49	354,03	46,33	5,71

Každá skupina obsahovala dva potkany označené **1** a **2**. Do tabulky byly vyneseny hodnoty získané dvěma nezávislými stanoveními jednoho vzorku. Potkani byli exponováni: **Fab A** – Fab fragmentům, **IgY B** – imunoglobulinu Y, **OVA C** – ovalbuminu, **PBS D** – fosfátovému pufru. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1), ***** – hodnoty naměřené na hranici detekce, **STD** – standard, **BAL** – bronchoalveolární laváž

Příloha č. 2

Stanovení koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami A549

Tab. č. 6: Koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami A549.

Testovaná látka	TNF- α [pg/ml]	odchylka TNF- α	IL-1 β [pg/ml]	odchylka IL-1 β
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0627	nezjištěno	0,2229
STD 1	0,52	0,0205	0,2	0,0388
STD 2	2,17	0,0277	0,61	0,0031
STD 3	10,55	0,0125	2,94	0,0295
STD 4	37,52	0,0013	12,49	0,0091
STD 5	131,9	0,0268	45,17	0,0249
STD 6	570,68	0,0378	193,76	0,0203
STD 7	2470,11	0,032	670,24	0,0118
STD 8	9099,92	0,0285	4872,42	0,0268
STD 9	115212,25	0,0546	6404,02	0,0479
Fab 1	x	0,0314	*0,14	0,0181
Fab 2	x	0,0566	*0,19	0,0107
Fab 3	x	0,0615	*0,14	0,006
IgY 1	x	0,0429	x	0,1286
IgY 2	x	0	x	0,0363
IgY 3	x	0	x	0
hlgG 1	x	0,0429	x	0,0314
hlgG 2	x	0,0456	x	0,0615
hlgG 3	x	0,0224	x	0,0589
glgG 1	x	0,0488	x	0
glgG 2	x	0	x	0,0673
glgG 3	x	0	x	0,0673
OVA 1	x	0	x	0,0987
OVA 2	x	0	x	0,0707
OVA 3	x	0	x	0,0345
LPS 1	x	0,0615	x	0,0301
LPS 2	x	0,0345	x	0,0442
LPS 3	x	0	x	0,0329
PBS 1	x	0,0404	x	0,0429
PBS 2	x	0,1489	x	0,4919
PBS 3	x	0,0832	x	0,2357

DMEM 1	x	0,0404	x	0,1088
DMEM 2	x	0,0211	x	0,0744
DMEM 3	x	0,0786	x	0,0363

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **DMEM** – kultivačnímu médiu pro buňky A549. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1), * – hodnoty naměřené na hranici detekce

Příloha č. 3

Stanovení koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami A549

Tab. č. 7: Koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami A549.

Testovaná látka	IL-6 [pg/ml]	odchylka IL-6	GM-CSF [pg/ml]	odchylka GM-CSF
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0502	nezjištěno	0,0408
STD 1	0,12	0,0505	x	0,1212
STD 2	0,69	0,0159	0,56	0
STD 3	3,04	0,011	2,37	0,0175
STD 4	10,05	0,0032	7,31	0
STD 5	36,89	0,015	25,35	0,0255
STD 6	159,59	0,0284	104,24	0,0072
STD 7	716,37	0,0204	471,3	0,0117
STD 8	2510,17	0,0205	1774,2	0,0212
STD 9	27237	0,0463	nezjištěno	0
Fab 1	55,65	0,01	18,39	0,0272
Fab 2	53,23	0,0081	10,66	0,013
Fab 3	71,64	0,0234	8,36	0,0391
IgY 1	4,22	0	x	0,1179
IgY 2	1,79	0,0301	x	0
IgY 3	2,99	0,0037	x	0
hlgG 1	1,2	0,0744	x	0,0524
hlgG 2	0,75	0,0307	x	0
hlgG 3	1,09	0,013	x	0
glgG 1	2,97	0,0149	x	0
glgG 2	2,2	0,0312	x	0
glgG 3	1,7	0,0103	x	0
OVA 1	2,1	0	x	0
OVA 2	1,09	0,0389	x	0,0267
OVA 3	1,2	0,0744	x	0
LPS 1	62,09	0,0048	1,7	0,0205
LPS 2	45,72	0,004	1,47	0,0218
LPS 3	42,47	0,0204	1,75	0,0404
PBS 1	2,46	0,0084	x	0,0429
PBS 2	0,9	0,1414	x	0,0456
PBS 3	2,17	0,1351	x	0

DMEM 1	2,6	0,0727	x	0,0884
DMEM 2	1,41	0,0228	x	0
DMEM 3	3,25	0,0211	x	0,0832

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **DMEM** – kultivačnímu médiu pro buňky A549. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1)

Příloha č. 4

Stanovení koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami NuLi-1 (expozice vzorkům Fab – gIgG)

Tab. č. 8: Koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami NuLi-1.

Testovaná látka	TNF- α [pg/ml]	odchylka TNF- α	IL-1 β [pg/ml]	odchylka IL-1 β
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0627	nezjištěno	0,2229
STD 1	0,52	0,0205	0,2	0,0388
STD 2	2,17	0,0277	0,61	0,0031
STD 3	10,55	0,0125	2,94	0,0295
STD 4	37,52	0,0013	12,49	0,0091
STD 5	131,9	0,0268	45,17	0,0249
STD 6	570,68	0,0378	193,76	0,0203
STD 7	2470,11	0,032	670,24	0,0118
STD 8	9099,92	0,0285	4872,42	0,0268
STD 9	115212,25	0,0546	6404,02	0,0479
Fab 1	x	0,0643	13,25	0,0353
Fab 2	x	0,0903	10,95	0,1332
Fab 3	x	0	5,88	0,0193
IgY 1	x	0,2598	*0,04	0,0086
IgY 2	*0,10	0,0488	*0,02	0,0832
IgY 3	x	0	*0,07	0
hIgG 1	x	0,0194	*0,01	0,0106
hIgG 2	*0,03	0,0127	*0,02	0,104
hIgG 3	*0,02	0,0257	*0,01	0,0055
gIgG 1	x	0	0,89	0,0051
gIgG 2	x	0,0363	0,44	0,0219
gIgG 3	*0,41	0,062	0,26	0,1814

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1), ***** – hodnoty naměřené na hranici detekce

Příloha č. 5

Stanovení koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami NuLi-1 (expozice vzorkům Fab - gIgG)

Tab. č. 9: Koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami NuLi-1.

Testovaná látka	IL-6 [pg/ml]	odchylka IL-6	GM-CSF [pg/ml]	odchylka GM-CSF
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0502	nezjištěno	0,0408
STD 1	0,12	0,0505	x	0,1212
STD 2	0,69	0,0159	0,56	0
STD 3	3,04	0,011	2,37	0,0175
STD 4	10,05	0,0032	7,31	0
STD 5	36,89	0,015	25,35	0,0255
STD 6	159,59	0,0284	104,24	0,0072
STD 7	716,37	0,0204	471,3	0,0117
STD 8	2510,17	0,0205	1774,2	0,0212
STD 9	27237	0,0463	nezjištěno	0
Fab 1	176,74	0,0112	9,29	0,0433
Fab 2	76,77	0,1314	6,27	0,1635
Fab 3	77,68	0,0279	3,35	0
IgY 1	838,27	0,1269	0,02	0,0382
IgY 2	655,93	0,0155	x	0,0404
IgY 3	914,03	0,0134	0,07	0,0744
hIgG 1	93,19	0,0293	0,07	0
hIgG 2	49,39	0,0266	0,26	0
hIgG 3	54,79	0,1267	0,11	0,0363
gIgG 1	172,9	0,0035	2,48	0,017
gIgG 2	143,64	0,0945	1,25	0,0232
gIgG 3	67,8	0,0339	1,06	0,1184

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1)

Příloha č. 6

Stanovení koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami NuLi-1 (expozice vzorkům OVA - BEGM)

Tab. č. 10: Koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami NuLi-1.

Testovaná látka	TNF- α [pg/ml]	odchylka TNF- α	IL-1 β [pg/ml]	odchylka IL-1 β
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0672	nezjištěno	0,0751
STD 1	0,64	0,0277	0,17	0,009
STD 2	2,23	0	0,78	0,0372
STD 3	8,27	0,0172	2,74	0,0132
STD 4	37,13	0,0324	11,49	0,0236
STD 5	156,01	0,0043	47,37	0,0157
STD 6	583,75	0,0141	188,09	0,0328
STD 7	2225,76	0,0045	696,57	0,0029
STD 8	9754,77	0,0155	3043,96	0,0316
STD 9	72733,28	0,0455	nezjištěno	nezjištěno
OVA 1	*0,10	0,0707	0,18	0,0088
OVA 2	*0,06	0,0363	0,2	0,06
OVA 3	*0,19	0	0,24	0,0081
LPS 1	*0,43	0,0903	0,32	0,0437
LPS 2	*0,24	0,0329	1,96	0,0123
LPS 3	*0,33	0,0314	0,32	0,0073
PBS 1	*0,15	0,0345	x	0,0389
PBS 2	*0,10	0	x	0,0267
PBS 3	x	0,0382	x	0,0466
BEGM 1	*0,04	0,0184	x	0,0289
BEGM 2	*0,28	0	x	0,0248
BEGM 3	*0,19	0,1347	*0,01	0,0859

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky NuLi-1. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1), ***** – hodnoty naměřené na hranici detekce

Příloha č. 7

Stanovení koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami NuLi-1 (expozice vzorkům OVA - BEGM)

Tab. č. 11: Koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami NuLi-1.

Testovaná látka	IL-6 [pg/ml]	odchylka IL-6	GM-CSF [pg/ml]	odchylka GM-CSF
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0206	nezjištěno	0,0782
STD 1	0,15	0	0,06	0,0943
STD 2	0,67	0,0211	0,48	0,0382
STD 3	2,5	0,0255	1,8	0
STD 4	9,95	0,0143	6,87	0
STD 5	42,59	0,0129	27,29	0,0016
STD 6	160,18	0,0345	111,29	0,0503
STD 7	649,62	0,0105	444,48	0,0116
STD 8	2629,46	0,0148	1772,31	0,0192
STD 9	25852,65	0,0304	17738,95	0,0401
OVA 1	128,36	0,0254	1,42	0,0142
OVA 2	123,62	0,0593	1,11	0,0111
OVA 3	102,8	0,0177	1,17	0,0117
LPS 1	748,28	0,011	14,99	0,1499
LPS 2	613,61	0,022	11,21	0,1121
LPS 3	846,64	0,0132	12,05	0,1205
PBS 1	128,64	0,0069	2,06	0,0206
PBS 2	132,75	0,0385	1,8	0,018
PBS 3	101,87	0,0493	1,36	0,0136
BEGM 1	78,59	0,0181	1,04	0,0104
BEGM 2	94,82	0,0069	1,36	0,0136
BEGM 3	131,46	0,0014	2,12	0,0212

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky NuLi-1. **STD** – standard

Příloha č. 8

Stanovení koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami CuFi-1

Tab. č. 12: Koncentrace cytokinů TNF- α a IL-1 β produkovaných buňkami CuFi-1.

Testovaná látka	TNF- α [pg/ml]	odchylka TNF- α	IL-1 β [pg/ml]	odchylka IL-1 β
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0672	nezjištěno	0,0751
STD 1	0,64	0,0277	0,17	0,009
STD 2	2,23	0	0,78	0,0372
STD 3	8,27	0,0172	2,74	0,0132
STD 4	37,13	0,0324	11,49	0,0236
STD 5	156,01	0,0043	47,37	0,0157
STD 6	583,75	0,0141	188,09	0,0328
STD 7	2225,76	0,0045	696,57	0,0029
STD 8	9754,77	0,0155	3043,96	0,0316
STD 9	72733,28	0,0455	nezjištěno	nezjištěno
Fab 1	*0,19	0	2,72	0,0247
Fab 2	*0,15	0,0345	3,26	0,0148
Fab 3	*0,28	0,0643	3,84	0,0137
IgY 1	*0,24	0,0329	*0,11	0,0147
IgY 2	0,88	0,2421	*0,04	0,0164
IgY 3	*0,19	0	x	0,0125
hIgG 1	*0,48	0,0589	*0,07	0,0624
hIgG 2	0,75	0,1868	0,21	0,0932
hIgG 3	*0,15	0,0345	*0,03	0,0224
gIgG 1	*0,19	0,0673	0,61	0,0161
gIgG 2	*0,38	0	0,59	0,0548
gIgG 3	1,08	0,2157	0,86	0,2089
OVA 1	*0,43	0,0301	x	0,0267
OVA 2	*0,33	0,0943	0,25	0,0161
OVA 3	0,64	0,0277	1,28	0,0235
LPS 1	1,4	0,1644	0,35	0,0603
LPS 2	1,26	0,2737	*0,13	0,0095
LPS 3	0,69	0	*0,16	0,0091
PBS 1	*0,38	0	*0,02	0,0113
PBS 2	1,67	0,0205	*0,07	0,1689
PBS 3	*0,24	0,0329	x	0
BEGM 1	*0,24	0,0329	x	0,0429
BEGM 2	*0,43	0,0301	x	0,0253
BEGM 3	1,28	0,2914	0,22	0,0749

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1. **STD** – standard, **x** – hodnoty pod hranicí detekce (viz. STD 1), * – hodnoty naměřené na hranici detekce

Příloha č. 9

Stanovení koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami CuFi-1

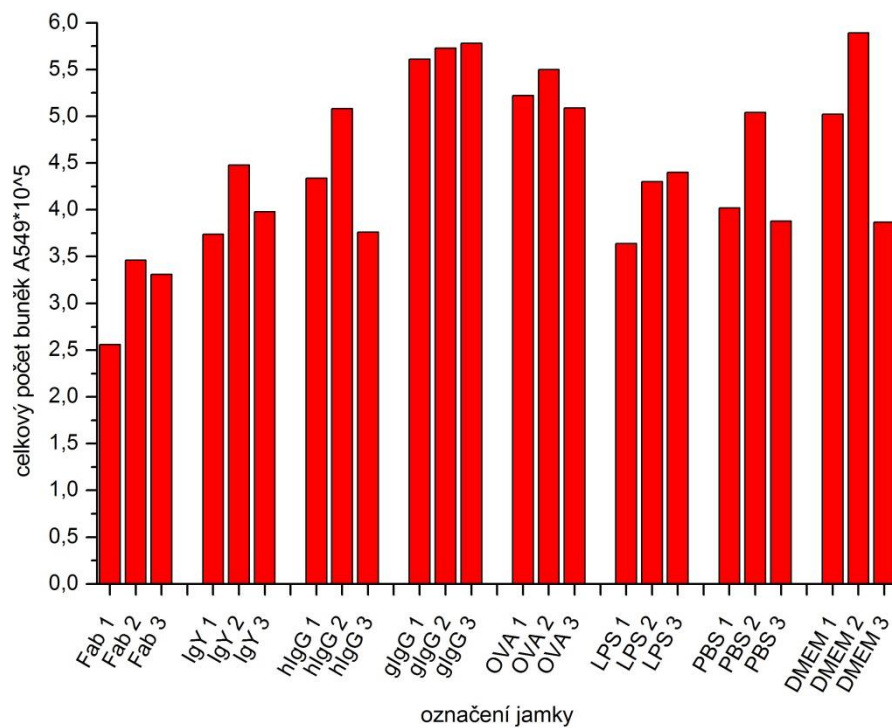
Tab. č. 13: Koncentrace cytokinů IL-6 a GM-CSF produkovaných buňkami CuFi-1.

Testovaná látka	IL-6 [pg/ml]	odchylka IL-6	GM-CSF [pg/ml]	odchylka GM-CSF
prázdný vzorek	nezjištěno	0,0206	nezjištěno	0,0782
STD 1	0,15	0	0,06	0,0943
STD 2	0,67	0,0211	0,48	0,0382
STD 3	2,5	0,0255	1,8	0
STD 4	9,95	0,0143	6,87	0
STD 5	42,59	0,0129	27,29	0,0016
STD 6	160,18	0,0345	111,29	0,0503
STD 7	649,62	0,0105	444,48	0,0116
STD 8	2629,46	0,0148	1772,31	0,0192
STD 9	25852,65	0,0304	17738,95	0,0401
Fab 1	219,87	0,0003	1,74	0,0248
Fab 2	375,87	0,0055	2,89	0,0189
Fab 3	323,35	0,0067	3,09	0,0363
IgY 1	669,39	0,0048	0,58	0,0184
IgY 2	680,65	0,0424	0,55	0,0744
IgY 3	794,59	0,0022	0,42	0
hlgG 1	340,5	0,0371	1,36	0,0832
hlgG 2	368,47	0,0996	1,14	0,0744
hlgG 3	299,39	0,0232	1,11	0,0903
glgG 1	470,05	0,0048	1,68	0,0505
glgG 2	500,49	0,0249	1,61	0,0257
glgG 3	705,27	0,1857	1,68	0,1515
OVA 1	434,3	0,0017	1,49	0,0267
OVA 2	408,81	0,0078	1,3	0
OVA 3	270,33	0,0039	1,87	0,024
LPS 1	1823,17	0,0791	3,99	0,0922
LPS 2	1407,07	0,1213	3,05	0,0639
LPS 3	1754,61	0,0626	3,7	0,0081
PBS 1	370,59	0,0199	1,61	0,0771
PBS 2	220,04	0,0595	1,64	0,0892
PBS 3	300,5	0,0072	1,23	0,0289
BEGM 1	277,59	0,0535	1,3	0,0566
BEGM 2	283,03	0,0214	1,42	0
BEGM 3	490,58	0,1241	1,52	0,0983

Každá skupina obsahovala tři jamky označené **1, 2, 3**. Koncentrace cytokinů byla v každé jamce stanovena dvěma nezávislými měřeními. Do tabulky byly vyneseny hodnoty jejich průměrů včetně směrodatných odchylek. Buňky byly exponovány: **Fab** – Fab fragmentům, **IgY** – imunoglobulinu Y, **hIgG** – lidskému imunoglobulinu G, **gIgG** – kozímu imunoglobulinu G, **OVA** – ovalbuminu, **LPS** – lipopolysacharidu, **PBS** – fosfátovému pufru, **BEGM** – kultivačnímu médiu pro buňky CuFi-1. **STD** – standard

Příloha č. 10

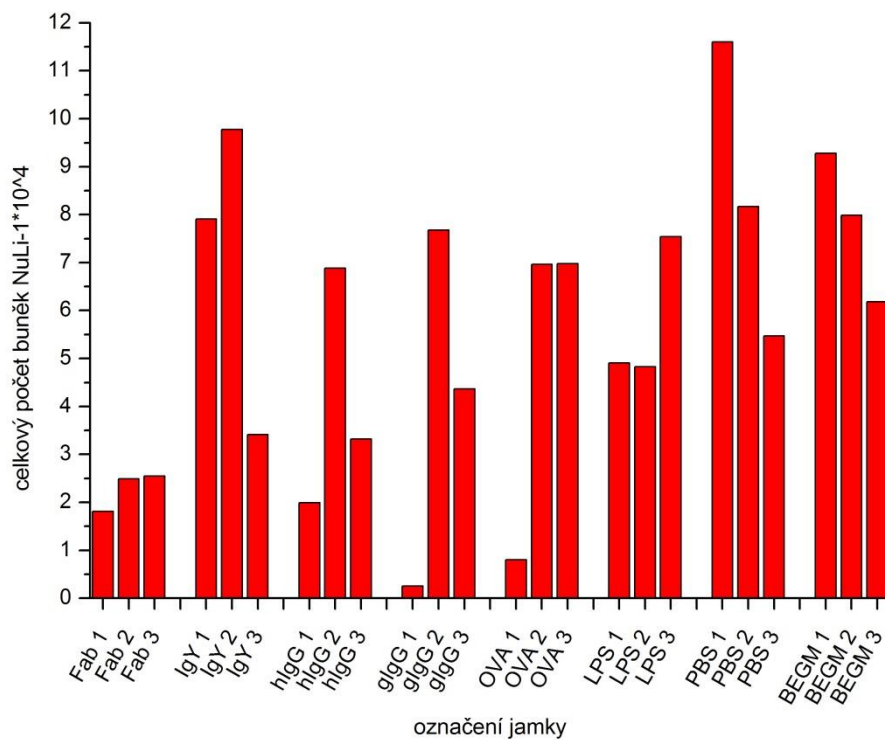
Celkový počet buněk A549 v jamkách



Obr. 29: Celkový počet buněk A549 v jednotlivých jamkách. Pro uvolnění buněk z povrchu jamky byl použit digesční roztok 0,25% (w/v) trypsinu s obsahem 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA.

Příloha č. 11

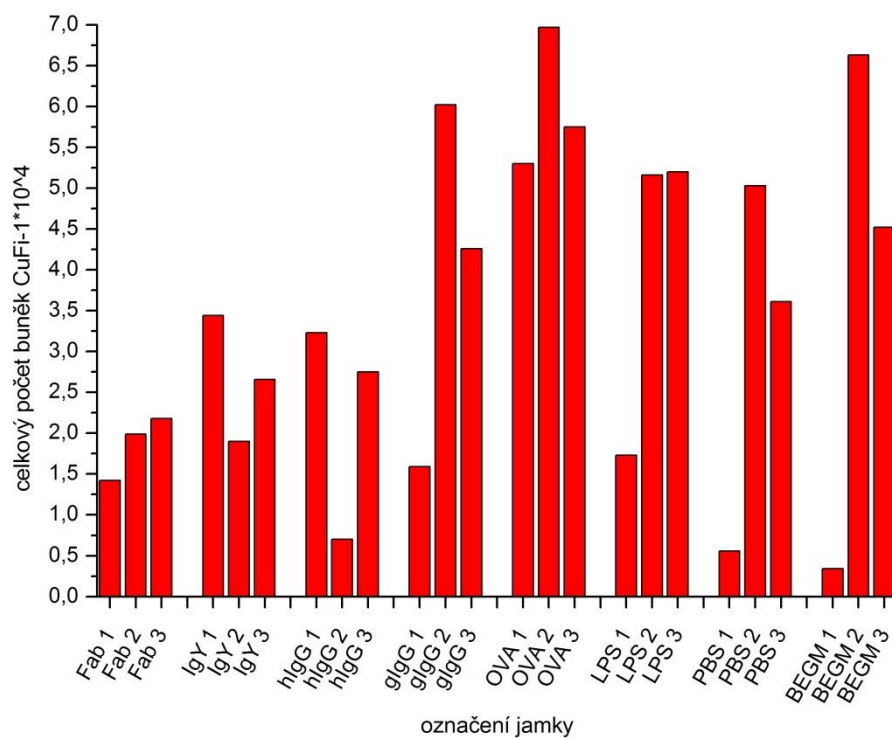
Celkový počet buněk NuLi-1 v jamkách



Obr. 30: Celkový počet buněk NuLi-1 v jednotlivých jamkách. Pro uvolnění buněk z povrchu jamky byl použit digesční roztok 0,25% (w/v) trypsin s obsahem 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA.

Příloha č. 12

Celkový počet buněk CuFi-1 v jamkách



Obr. 31: Celkový počet buněk CuFi-1 v jednotlivých jamkách. Pro uvolnění buněk z povrchu jamky byl použit digesční roztok 0,25% (w/v) trypsin s obsahem 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]